



Etude du rôle des sidérophores microbiens dans la modulation des défenses de la plante *Arabidopsis thaliana*

Aude Aznar

► To cite this version:

Aude Aznar. Etude du rôle des sidérophores microbiens dans la modulation des défenses de la plante *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112082 . tel-01249389

HAL Id: tel-01249389

<https://theses.hal.science/tel-01249389>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes (LIPP)
Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB)

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le 21/05/2014

par

Aude AZNAR

Etude du rôle des sidérophores microbiens dans la
modulation des défenses de la plante *Arabidopsis*
thaliana

Composition du jury :

Directeur de thèse :

Rapporteurs :

Examineurs :

Alia DELLAGI
Petra BAUER
Harald KELLER
Graham NOCTOR
Arnould SAVOURE

MC AgroParisTech (AgroParisTech Paris, France)
Professeur (Université de Düsseldorf, Allemagne)
DR INRA (INRA Sophia-Antipolis, France)
Professeur (Université Paris Sud, France)
Professeur (UPMC, France)

Remerciements

Après ces quelques lignes se trouvent "résumés" trois ans et demi de travail, de rencontre, d'échange, de partage, de doutes et de convictions.

Je remercie Petra Bauer, Harald Keller, Graham Noctor et Arnould Savouré d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Alia, je te remercie de m'avoir accordée ta confiance et de m'avoir encadrée pendant le stage de M2 et la thèse. Je ne sais pas comment j'aurai pu me retrouver "dans de meilleures mains" pour cette aventure scientifique et humaine. Parce que travailler avec toi signifie rigueur et précision mais aussi respect et épanouissement.

Merci à toi Martine qui a toujours le sourire, quelles que soient les circonstances. Ma liste de compétences techniques a centuplé grâce à toi, mais bien sûr il n'y a pas que ça... J'ai aussi une "maman" et une amie de plus. Je ne sais pas encore ce qui suivra dans ma vie professionnelle, mais la barre est très haute. Avec Alia, vous vous êtes donné le mot pour que je reste dans la recherche en espérant retrouver ce sentiment...Merci!

Merci également à Dominique Expert pour m'avoir accueillie au laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes. Tu es toujours disponible et prête à partager de bons conseils, notamment quand il s'agit de rédaction!

Un très grand merci aux membres de mon comité de thèse: Marie Garmier, Sébastien Thomine et Jean Colcombet. Un merci particulier à Sébastien Thomine pour son expertise et sa disponibilité. Merci aussi à Jean Colcombet pour son dynamisme communicatif, sa patience et sa gentillesse. Je suis vraiment très contente d'avoir eu l'occasion de travailler avec toi.

Oriane, grâce à toi, ce que j'appréhendais comme de longues heures de solitude au microscope se sont transformées des heures pleines de bonne humeur et de découverte d'expressions limousines...j'en tombe de cul! Ce n'est pas Alban qui dira le contraire. Merci à toi aussi Alban, ça été un vrai plaisir de pouvoir partager les bons et les mauvais moments avec mon jumeau de labo. Ca a vraiment été génial de partager le bureau et 4 "wall" ensemble. Merci à Nicolas Chen pour ces bons mots, ceux qui font sourire et ceux qui conseillent; tes étudiants ont de la chance.

Merci aussi à tout le bâtiment 3 pour son accueil, en particulier aux "filles" du bureau.

Je n'aurai jamais pu écrire cette thèse sans quelques années d'études et de soutien en tout genre. Pour ça merci à vous les parents (tous les 4), Marie et François, Mathilde et Julien.

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
ABRÉVIATIONS	7
NOTICE DE NUMÉROTATION DES FIGURES	9
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	13
1. L'ACQUISITION ET LE STOCKAGE DU FER CHEZ LES MICROORGANISMES BACTÉRIENS ET FONGIQUES	13
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE FER EN DANS LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES	13
1.2. L'ACQUISITION DU FER PAR LES SIDÉROPHORES.	15
1.2.1 Les différents types de sidérophores	15
1.2.2. La biosynthèse et la sécrétion des sidérophores.....	15
1.2.3. Le transport des ferri-sidérophores et l'acquisition du fer.....	19
1.3. LES AUTRES SYSTÈMES D'ACQUISITION DU FER.....	19
1.3.1. Chez les bactéries	19
1.3.2. Chez les champignons.....	23
1.4. LE STOCKAGE DU FER CHEZ LES MICROORGANISMES	25
1.4.1. Le stockage du fer chez les bactéries.....	25
1.4.2. Le stockage du fer chez les champignons.....	26
1.5. LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME DU FER	26
1.5.1. Le régulation du métabolisme du fer chez les bactéries.....	26
1.5.2. La régulation du métabolisme du fer chez les champignons.....	29
1.6. LE COUPLAGE ENTRE LE FER ET LA PATHOGENIE CHEZ LES BACTÉRIES ET LES CHAMPIGNONS PATHOGENES	31
2. LE MÉTABOLISME DU FER CHEZ LES PLANTES	33
2.1. LES BESOINS EN FER CHEZ LES VÉGÉTAUX ET LES RÉPERCUSSIONS D'UNE CARENCE PHYSIOLOGIQUE.....	33
2.2. LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES D'ACQUISITION DU FER CHEZ LES ANGIOSPERMES	33
2.3. LA CIRCULATION ET LE STOCKAGE DU FER DANS LA PLANTE	36
2.3.1. La circulation du fer dans la plante	37
2.3.2. Le stockage du fer intracellulaire.....	41
2.4. LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME DU FER	45
2.4.1. La perception du fer chez les plantes.....	45
2.4.2. Les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme du fer	47
2.4.3. La régulation hormonale du métabolisme du fer	51
3. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES INTERACTIONS PLANTES – AGENTS PATHOGENES.....	55
3.1. ÉTAPE 1 : ATTEINDRE LES TISSUS VÉGÉTAUX	55

3.1.1. Les stratégies d'infection des microorganismes pathogènes	55
3.1.1.1. Les stratégies d'attaque	57
3.1.1.1.1. La dégradation de la paroi de la cellule végétale	57
3.1.1.1.2. La sécrétion de composés phytotoxiques	57
3.1.1.2. La protection des structures d'infection	58
3.1.1.3. La suppression des réponses immunitaires de la cellule végétale.....	58
3.1.2. Les défenses préexistantes des végétaux	61
3.2. ETAPE 2 : LA RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE ET L'INDUCTION DES DÉFENSES DES PLANTES.....	61
3.2.1. La reconnaissance de motifs moléculaires associés à la présence de microorganismes (MAMP) ou aux dégâts (DAMP).....	63
3.2.1.1. Les MAMP et les récepteurs associés	63
3.2.1.1.1. La flagelline	65
3.2.1.1.2. La chitine	66
3.2.1.2. Les DAMPs et récepteurs associés	67
3.2.2. Les effecteurs microbiens et les molécules associées à la résistance de la plante	69
3.2.2.1. La reconnaissance de l'effecteur microbien par les récepteurs intracellulaires NB-LRR	69
3.2.2.2. La production d'une cible mutée de l'effecteur microbien	71
3.2.2.2.1. L'effecteur microbien cible une séquence nucléotidique	71
3.2.2.2.2. L'effecteur microbien cible une protéine	72
3.2.3. Les conséquences de la reconnaissance: une réponse immunitaire adaptée.....	73
3.2.3.1. La fermeture stomatique	73
3.2.3.2. La synthèse et l'accumulation de phytoalexines.....	75
3.2.3.3. Le renforcement des parois végétales	75
3.2.3.4. La génération de formes actives de l'oxygène	77
3.2.3.5. La production de protéines de type PR.....	79
3.2.3.6. La mort cellulaire programmée.....	81
3.2.3.7. La signalisation déclenchée par la cellule végétale suite à la perception du microbe	81
3.2.3.7.1. La perception des MAMP est relayée par des événements de phosphorylation et de déphosphorylation.....	81
3.2.3.7.2. La perception des MAMP engendre des flux calciques.....	82
3.2.3.7.3. Les petits ARN contribuent à la transduction du signal MAMP.....	83
3.2.3.7.4. Les phytohormones sont une composante essentielle de la mise en place des défenses induites par la reconnaissance d'un agent pathogène	83
o L'auxine	83
o Les gibbérellines	85
o Les cytokinines.....	85
o L'acide abscissique	87
o Les brassinostéroïdes	87
o L'éthylène	87
o L'acide salicylique ou salicylate	89
o L'acide jasmonique ou jasmonate	95

4. L'INTERACTION ENTRE LA BACTÉRIE PATHOGÈNE <i>DICKEYA DADANTII</i> ET LA PLANTE MODÈLE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	99
4.1. PRÉSENTATION DE <i>DICKEYA DADANTII</i>	99
4.1.2. Les facteurs du pouvoir pathogène de <i>D. dadantii</i>	99
4.1.2.1. Les déterminants moléculaires du pouvoir pathogène	99
4.1.2.1.1. Les pectinases sécrétées par <i>D. dadantii</i> lors de l'infection	99
4.1.2.1.2. Le système de sécrétion de type III de <i>D. dadantii</i>	103
4.1.2.1.3. La protection contre les composés toxiques	103
4.2. L'ARSENAL DÉFENSIF DÉPLOYÉ PAR LA PLANTE INFECTÉE : LE CAS D' <i>A. THALIANA</i>	104
5. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	107
5.1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THÈSE	107
5.2. OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE	109
CHAPITRE II : LES SIDEROPHORES MICROBIENS DECLENCHENT DES REPONSES DE DEFENSE ET PERTURBENT LE METABOLISME DU FER CHEZ <i>A. THALIANA</i>	115
PRÉAMBULE	115
ABSTRACT	117
RESULTS	122
DISCUSSION	135
CONCLUSION	145
MATERIALS AND METHODS	146
REFERENCES	152
CHAPITRE III : <i>MPK11</i>: UN GENE IMPLIQUE DANS LES REPONSES AU STRESS BIOTIQUE ET A LA CARENCE EN FER	159
PRÉAMBULE	159
INTRODUCTION	161
RÉSULTATS	165
CONCLUSION	173
DISCUSSION	173
MÉTHODES :	176
CHAPITRE IV : ETUDE DE LA REPARTITION DU FER AU COURS DE L'INTERACTION ENTRE <i>A. THALIANA</i> ET <i>D. DADANTII</i>	179
PRÉAMBULE	179
SUMMARY	181
INTRODUCTION	183
RESULTS	186
DISCUSSION	191

MATERIALS AND METHODS	196
REFERENCES	200
CHAPITRE V : ETUDE DE L'IMPACT DU STATUT EN FER D'A. <i>THALIANA</i> AU COURS DE L'INTERACTION AVEC D. <i>DADANTII</i> ET B. <i>CINEREA</i>	205
PRÉAMBULE.....	205
SUMMARY.....	207
INTRODUCTION	208
RESULTS.....	211
DISCUSSION.....	217
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	225
REFERENCES	228
CHAPITRE VI : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	235
1. COMMENT LES SIDÉROPHORES SONT-ILS PERÇUS PAR LES PLANTES?	235
1.1. Existe-t-il un récepteur des sidérophores chez la cellule végétale?.....	235
1.2. Quel est le mécanisme de perception des sidérophores chez la cellule végétale?	237
1.3. Comment le signal déclenché par les sidérophores est-il transmis aux racines?.....	238
2. COMMENT LE MÉTABOLISME DU FER INFLUENCE-T-IL LES RÉPONSES IMMUNITAIRES D'A. <i>THALIANA</i> ?	239
3. QUELS SONT LES ACTEURS MOLÉCULAIRES COMMUNS AU MÉTABOLISME DU FER ET À L'IMMUNITÉ?	243
3.1. La production de formes actives de l'oxygène.....	243
3.2. L'accumulation d'acide salicylique.....	243
4. CONCLUSION GÉNÉRALE	244
5. PERSPECTIVES	244
6. PROJET DE REVUE: " MICROBIAL SIDEROPHORES MODULATE HOST IMMUNITY"	246
Abstract	247
Role of siderophores in pathogenicity	250
Siderophores and animal Immune responses.....	251
Siderophores and plant Immune responses.....	253
Discussion	257
Future prospects:.....	259

Abréviations

ABA	Acide abscissique
ABC	ATP-Binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Bfr	Bacterioferritine
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
CB	Chrysobactine
Col-0	Columbia 0
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DFO	Deferrioxamine
DtxR	Diphtheria toxin regulator
EGF	Epidermal Growth Factor
Et	Ethylène
ETI	Effector triggered immunity
ETS	Effector triggered susceptibility
FAO	Formes Actives de l'Oxygène
Fbp	Ferritin Binding Protein
Feo	Ferrous iron transport
Fur	Ferric uptake regulator
Ga	Gibbéreline
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HR	Hypersensitive response
IDE	Iron Deficiency-responsives Element
IDRS	Iron-Dependent Regulatory Sequence
IRGF	Iron-Responsive GATA Factor
ISR	Induced systemic resistance
ITP	Iron Transport Protein
JA	Acide jasmonique
Lbp	Lactoferrin Binding Protein
Ler	Landsberg erecta
LRR	Leucine rich repeat
MA	Mugineic acid
MAMP	Microbial-associated molecular patterns
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MFS	Major Facilitator Superfamily
NA	Nicotianamine
NLS	Nuclear localization sequence
NRPS	Non-Ribosomal Peptide Synthetase
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBP	Periplasmic Binding Protein
PCP	Peptide Carrier Protein
PRR	Pattern-Recognition Receptor
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>

PTI	PAMP triggered immunity
RBOH	Respiratory Burst Oxidase Homologue
RIA	Reductive Iron Assimilation
ROS	Reactive oxygen species
SA	Acide salicylique
SAR	Systemic acquired resistance
SOD	Superoxyde dismutase
SST3	Système de sécrétion de type III
TAL	Transcription Activator-Like
Tbp	Transferrin Binding Protein
UMF/SIT	Unknown Major Facilitator/Siderophore Iron Transporter
Ws	Wassilewskija
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>

Notice de numérotation des figures

Le manuscrit est divisé en six chapitres comportant chacun des figures. A l'intérieur d'un chapitre, les figures sont numérotées à partir de la figure dite « Figure 1 ». Lorsque dans un chapitre, une référence renvoie à une figure présente dans un autre chapitre, celle-ci est présentée comme cet exemple :

Figure **III.2.**

Cela signifie que le texte fait référence à la Figure **2** du chapitre **III**.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Dans la première partie de cette introduction, une vue d'ensemble des systèmes d'acquisition et de stockage du fer chez les microorganismes sera présentée. Puis, je décrirai dans une seconde partie le pendant végétal de l'acquisition et du stockage du fer. La troisième partie de l'introduction nous amènera à explorer les interactions entre les plantes et les microorganismes pathogènes. Enfin, la dernière partie se focalisera sur les apports de la littérature sur l'interaction entre la plante *Arabidopsis. thaliana* et la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*.

1. L'acquisition et le stockage du fer chez les microorganismes bactériens et fongiques

1.1. Généralités sur le fer en dans les systèmes biologiques

Le fer est très abondant sur Terre : il atteint la 4^{ème} position en tant qu'élément et la 2^{ème} en tant que métal. Il est essentiel pour presque tous les organismes vivants (Crichton, 2002). En effet, sa capacité à facilement échanger des électrons fait du fer un cofacteur de choix dans diverses réactions biochimiques vitales. Par exemple, le fer est un cofacteur d'enzymes indispensables telles que les ribonucléotides réductases de classe I, qui catalysent la réduction des ribonucléotides en désoxy-ribonucléotides (Stubbe and van der Donk, 1998). Le fer entre également dans la composition des centres fer-soufre [Fe-S], notamment dans les centres [Fe-S] des complexes I et II de la chaîne respiratoire (Crichton, 2002). On retrouve également le fer dans certaines protéines à hème comme la catalase, certains cytochromes et peroxydases. De ce fait, une déficience en fer provoque diverses conséquences pouvant entraîner des défauts de croissance et des changements morphologiques, diminuer la synthèse d'ADN et d'ARN, altérer le transport d'électrons requis pour certaines réactions biochimiques et réduire l'efficacité du microorganisme à détoxifier les formes actives de l'oxygène (FAO). Jusqu'à aujourd'hui, seuls les lactobactéries et l'agent pathogène de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, sont connus pour leur indépendance vis-à-vis du fer (Bruyneel et al., 1989; Posey, 2000).

Peu soluble en condition aérobiques et aux pH neutre et alcalin, le fer est peu biodisponible. Au cours de l'évolution, les microorganismes ont développé diverses stratégies d'acquisition du fer à haute affinité dont deux principales. L'une consiste à synthétiser des molécules à haute affinité pour le fer ferrique appelées « sidérophores » dans le milieu. L'autre consiste à importer des molécules à fer de l'hôte.

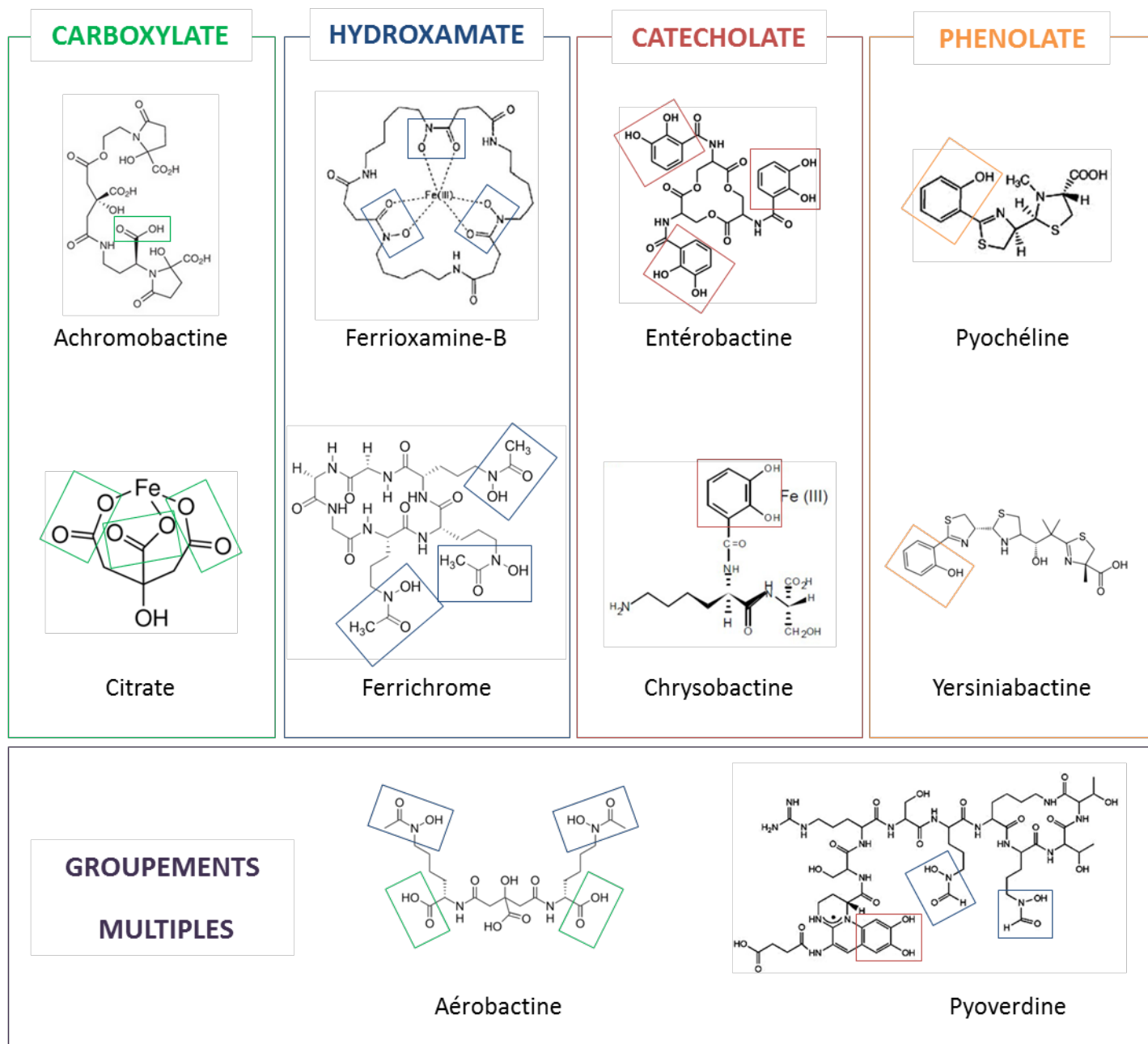


Figure I.1: Les différents types de structure des sidérophores et les groupements impliqués dans la chélation du fer.

1.2. L'acquisition du fer par les sidérophores.

L'utilisation de sidérophores pour assurer la nutrition en fer des microorganismes est le processus le plus répandu. Les sidérophores sont produits par presque tous les microorganismes, procaryotes ou eucaryotes étudiés, à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* (Miethke and Marahiel, 2007). Jusqu'à présent, plus de 500 sidérophores ont été identifiés (Miethke and Marahiel, 2007). Cependant, si ces trois espèces ne produisent pas elles-mêmes des sidérophores, elles possèdent la machinerie moléculaire permettant l'utilisation de sidérophores sécrétés par d'autres microorganismes, nommés alors xénosidérophores.

1.2.1 Les différents types de sidérophores

Lorsque les cellules microbiennes perçoivent une carence en fer, l'expression des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse et au transport des sidérophores est activée (Saha et al., 2013). Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire, de 400 à 1000 kDa, avec une forte affinité pour le fer Fe^{3+} et permettent la nutrition en fer des microorganismes (Saha et al., 2013). Ces molécules contiennent généralement l'un ou plusieurs de ces quatre groupements assurant la chélation des ions Fe^{3+} : les catécholates, les phénolates, les hydroxamates et les α -hydroxycarboxylates (Figure I.1) (Miethke and Marahiel, 2007). L'ion Fe^{3+} est chélaté par le sidérophore selon la denticité de ce dernier. Si le sidérophore est bidenté, le ratio fer-ligand est 1:3, si le sidérophore est hexadenté, le ratio est alors de 1:1 et la stabilité du complexe est augmentée (Winkelmann, 2002). L'affinité des sidérophores pour le fer est variable et peut être supérieure à $K_{\text{aff}} > 10^{30}$ M selon les conditions environnementales (Raymond and Carrano, 1979). Askwith et al. ont montré qu'un sidérophore peut extraire le fer de l'acier inoxydable (Askwith et al., 1996). Pour caractériser la capacité de chélation d'un sidérophore, on utilise le pFe. Le pFe est une valeur logarithmique dépendante du pH, attribuée au sidérophore par convention lorsque la concentration en ions $\text{Fe}(\text{III})$ est égale à 10^{-6} M et celle du ligand égale à 10^{-5} M, soit $\text{pFe} = -\log(\text{Fe}^{3+}_{\text{aq}} \text{ libre})$ à $\text{pH}=7,4$ (Boukhalfa and Crumbliss, 2002).

1.2.2. La biosynthèse et la sécrétion des sidérophores

La biosynthèse des sidérophores est effectuée selon l'un des deux processus suivants. L'un dépend d'une enzyme de type peptide synthase non ribosomale (NRPS, Non-Ribosomal Peptide Synthetase). L'autre ne dépend pas de ce type d'enzymes (Miethke and Marahiel, 2007). Généralement, la

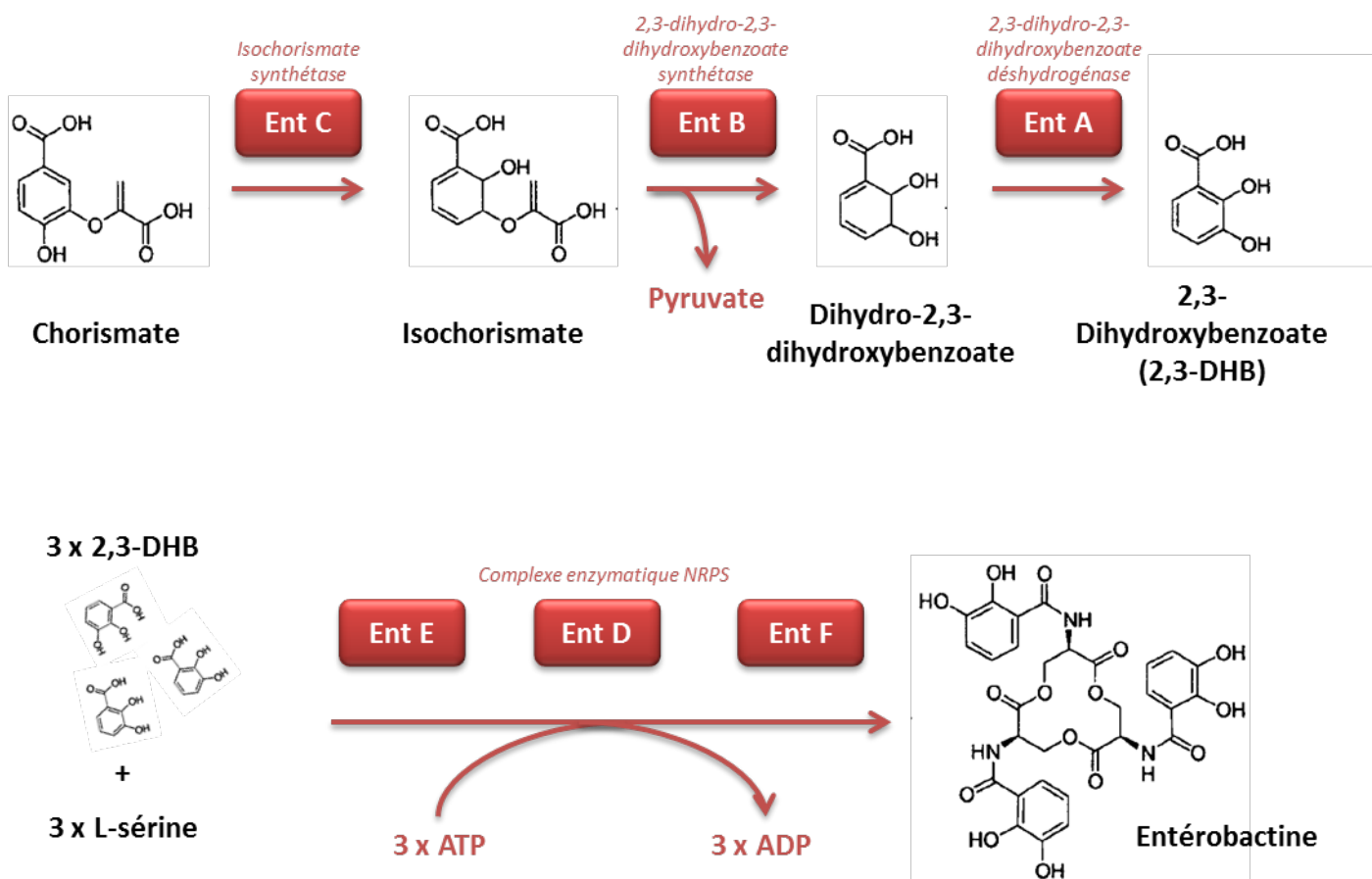


Figure I.2: Les principaux acteurs moléculaires de la biosynthèse NRPS de l'entérobactine chez la bactérie *E. coli*.

Les enzymes EntC, EntB et EntA de *E. coli* catalysent la production de 2,3-dihydrobenzoate (2,3-DHB), le précurseur de l'entérobactine, à partir du chorismate. Les enzymes EntE, EntD et EntF du complexe NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase) assurent l'activation de la sérine par adénylation, puis la liaison d'une sérine adénylée au 2,3-DHB (étape de thiolation) et enfin la cyclisation des trois molécules DHB-Ser et le relargage de l'entérobactine du complexe NRPS.

Modifié d'après Raymond *et al.*, 2003.

production des catécholates et phénolates requiert une activité NRPS et la synthèse des hydroxamates et α -hydroxycarboxylates est NRPS-indépendante (Miethke and Marahiel, 2007).

Les NRPS sont impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires tels que des toxines, des pigments ou des sidérophores. La biosynthèse par NRPS est réalisée *via* un complexe enzymatique possédant trois grands domaines fonctionnels dont les actions se résument en trois étapes: 1) adénylation, 2) thiolation, 3) condensation. La première réaction résulte en une adénylation d'un acide aminé précurseur. Au cours de la deuxième étape le domaine de thiolation, ou PCP pour Peptide Carrier Protein, assure la fixation de l'acide aminé adénylé au complexe enzymatique jusqu'à sa condensation réalisée par le domaine C. Lors de la dernière étape, le peptide ainsi formé peut alors être ajouté à une chaîne polypeptidique en formation, relâchée du complexe suite à sa cyclisation par le domaine thioestérase C-terminal (Kohli et al., 2001).

Chez les champignons, la majorité des sidérophores est produite via la voie de biosynthèse NRPS (Haas et al., 2008). La biosynthèse de l'entérobactine, réalisée par les complexes enzymatiques NRPS, est présentée en figure I.2 pour illustrer la synthèse NRPS des sidérophores (Raymond et al., 2003).

La chrysobactine, sidérophore identifié chez *D. dadantii*, est synthétisé par une voie NRPS (Enard et al., 1988). C'est un catéchol bidenté, dont le pFe est 17,1 (Persmark et al., 1989; Tomišić et al., 2008). Les gènes codant les enzymes de biosynthèse et les protéines de transport de la chrysobactine sont regroupés dans l'opéron *fct-cbsCEBA*, dont la séquence est homologue à celle de l'opéron codant les gènes de synthèse de l'entérobactine chez *E. coli* (Franza et al., 1991; Franza and Expert, 1991; Sauvage et al., 1996).

La synthèse des hydroxamates, qui est indépendante de la voie NRPS, s'effectue en deux temps. Tout d'abord, une N-hydroxylation est réalisée par une mono-oxygénase FAD-dépendante, puis a lieu la formylation, ou acylation, de l'amine hydroxylée par une acyle coenzyme A transférase. Une phase finale, catalysée par au moins une enzyme de type sidérophore synthétase, permet alors la ligation des unités et formation du sidérophore. L'exemple de la biosynthèse de la desferrioxamine (DFO) chez la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora* est représenté dans la figure I.3 (Dellagi et al., 1998; Expert et al., 2000; Smits et al., 2010).

Actuellement, la littérature apporte peu d'informations sur les mécanismes de sécrétion des sidérophores. L'export des sidérophores par la cellule microbienne serait assuré par des pompes à protons appartenant majoritairement à trois familles de transporteurs: les protéines MFS (Major Facilitator Superfamily) comme chez *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli* pour l'excrétion de la bacillibactine ou entérobactine respectivement; les protéines de la superfamille RND (nodulation and

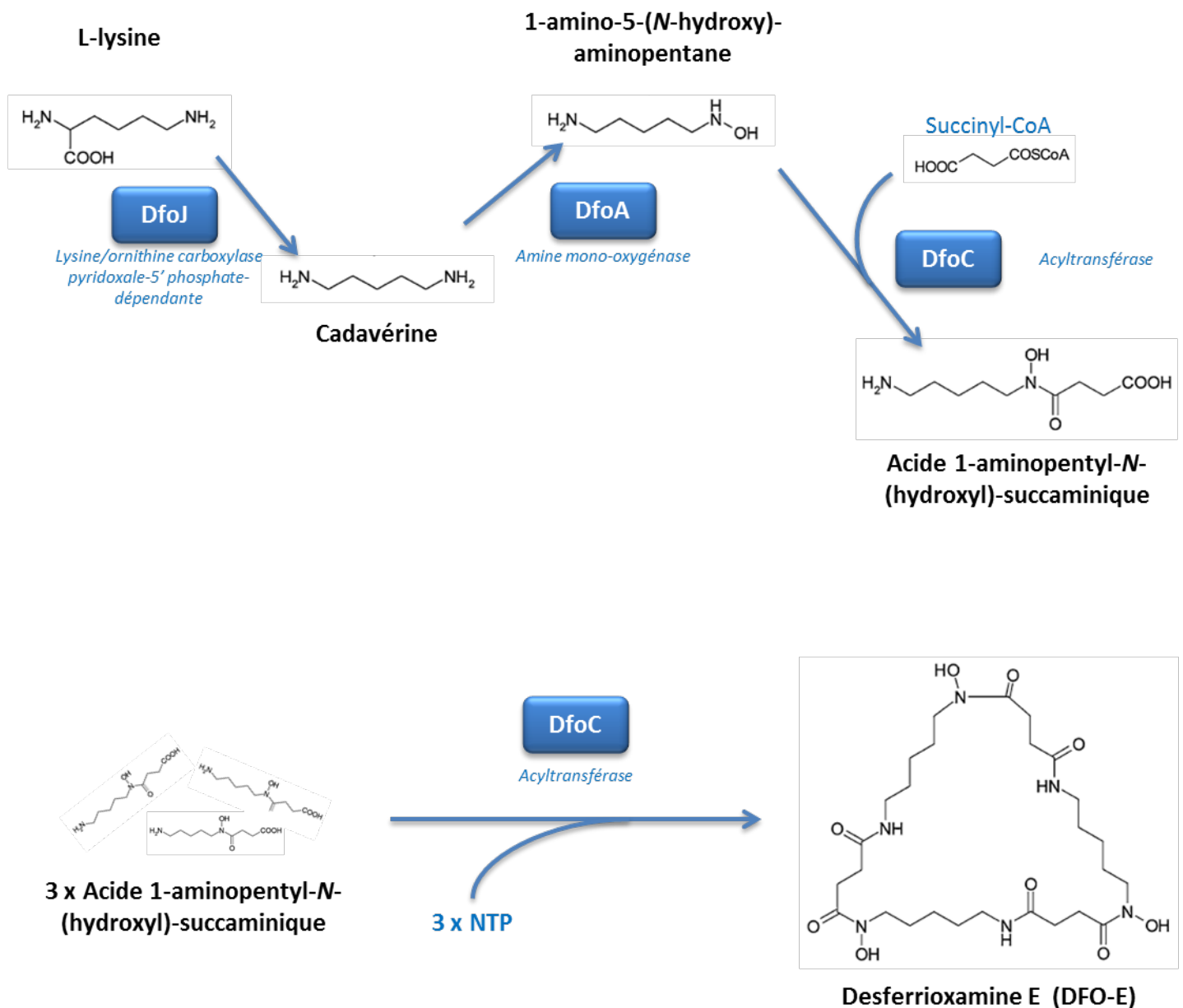


Figure I.3: Les principaux acteurs moléculaires de la biosynthèse de la desferrioxamine chez la bactérie *E. amylovora*.

La biosynthèse de desferrioxamine E (DFO-E) débute par une décarboxylation de la L-lysine catalysée par l'enzyme DfoJ et produit de la cadavérine. L'enzyme DfoA assure l'oxygénation d'un groupement amine de la cadavérine ce qui conduit à l'obtention de la 1-amino-5-(N-hydroxy)-aminopentane, à laquelle DfoC ajoute un succinyl-CoA pour former un intermédiaire nommé acide 1-aminopentyl-N-(hydroxyl)-succaminique. DfoC assure alors la trimérisation de cet intermédiaire et la cyclisation pour former la DFO-E.

Modifié d'après Smits et Duffy, 2011.

cell division) qui permettent l'excrétion de la pyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa*; ou encore les protéines de la superfamille ABC retrouvées chez *S. aureus* et *Mycobacterium smegmatis* (Miethke and Marahiel, 2007).

1.2.3. Le transport des ferri-sidérophores et l'acquisition du fer

Chez les bactéries à Gram négatif, il existe des récepteurs situés sur la membrane externe dépendant du complexe TonB, un complexe protéique de transduction de l'énergie, qui reconnaissent et transportent spécifiquement les ferri-sidérophores dans le périplasma. Une fois dans le périplasma, le complexe Fe-sidérophore est pris en charge par un transporteur ABC qui le véhicule dans le cytoplasme. L'acquisition des ferri-sidérophores des bactéries à Gram positif est réalisée par le même type de machinerie moléculaire basée sur les transporteurs ABC (Miethke and Marahiel, 2007).

Une fois dans la cellule microbienne, le fer est libéré du complexe ferri-sidérophore et donc mis à disposition des besoins métaboliques ou stocké pour éviter un stress oxydatif. Il existe deux mécanismes principaux de relargage du fer depuis le sidérophore. Le premier implique une réduction de la liaison fer-sidérophore par des réductases et le second résulte d'une compétition par une autre espèce chimique (Miethke and Marahiel, 2007). Quand le sidérophore est libre dans la cellule, celui-ci peut être à nouveau sécrété dans le milieu extérieur pour chélater les ions Fe^{3+} ou être utilisé intracellulairement pour le stockage du fer. Il arrive aussi que le sidérophore soit dégradé comme c'est le cas chez *D. dadantii* pour la chrysobactine par l'intermédiaire de la peptidase CbsH (Rauscher et al., 2002). La reconnaissance des ferri-sidérophores Fe-entérobactine et Fe-ferrichrome chez *E. coli* est illustrée en figure 1.4 (Garénaux et al., 2011).

Chez les champignons, le transport des ferri-sidérophores est assuré par des transporteurs de la membrane plasmique spécifiques UMF/SIT (Unknown Major Facilitator/Siderophore Iron Transporter) de la famille des transporteurs du type Major Facilitator Superfamily (Haas et al., 2008).

1.3. Les autres systèmes d'acquisition du fer

1.3.1. Chez les bactéries

Les bactéries pathogènes des mammifères ont la capacité de capturer le fer à partir de protéines présentes chez leur hôte. Il existe des récepteurs bactériens qui se fixent aux transferrines et lactoferrines, deux glycoprotéines de l'hôte spécialisées dans le transport du fer (Krewulak and

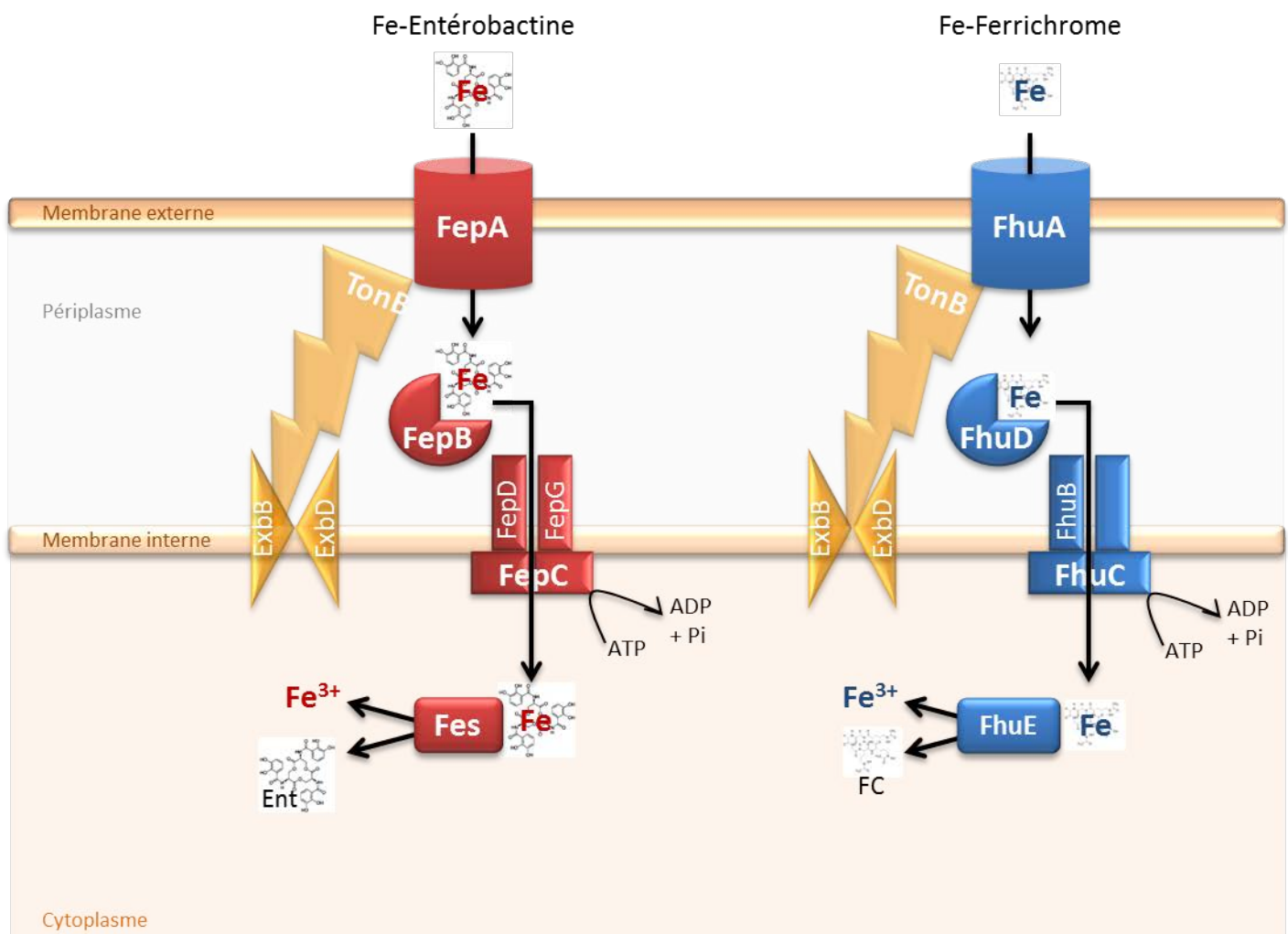


Figure I.4: Les récepteurs TonB-dépendant de l'entérobactine et du ferrichrome chez la bactérie *E. coli*.

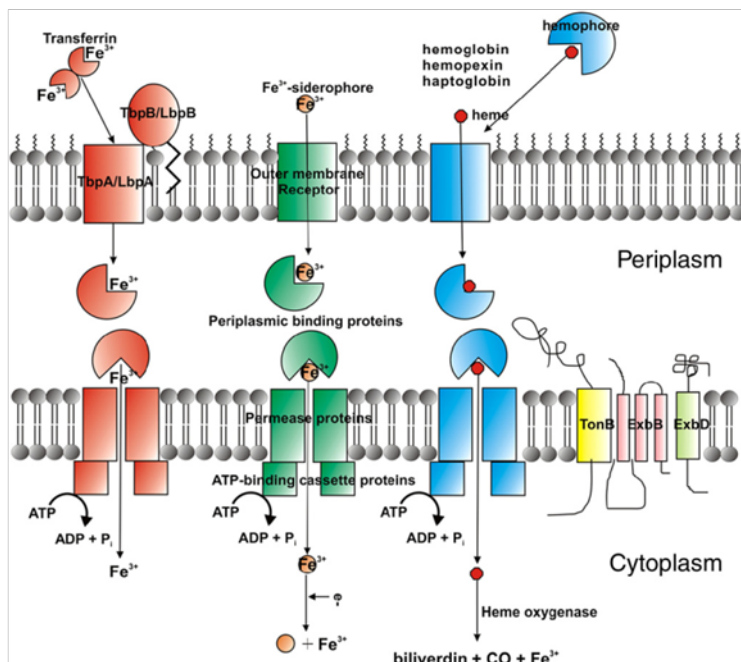
Les récepteurs FepA et FhuA de *E. coli* fixent respectivement les ferri-sidérophores Fe-entérobactine (Fe-Ent) et Fe-ferrichrome dans le milieu extérieur. FepA et FhuA transportent les ferri-sidérophores dans le périplasme grâce à l'énergie apportée par le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD. Une fois dans le périplasme, Fe-Ent et Fe-ferrichrome interagissent respectivement avec les protéines FepB et FhuD. Les complexes Fe-Ent-FepB et Fe-ferrichrome-FhuD sont dirigés vers un transporteur de type ATP-Binding Cassette (ABC) qui forme un canal dans la membrane interne et permet le passage du ferrisiderophore dans le cytoplasme. Les protéines FepC, FepD et FepG constituent le transporteur ABC de Fe-Ent. Les protéines FhuE et FhuB constituent le transporteur ABC de Fe-ferrichrome. Une fois dans le cytoplasme, Fe-Ent et Fe-ferrichrome sont hydrolysés respectivement par les estérases Fes et FhuE, permettant le relargage de Fe³⁺ dans la cellule.

Vogel, 2008). Les hémoprotéines de l'hôte représentent également une source de fer pour les bactéries (Krewulak and Vogel, 2008). Celles-ci sont capables de se fixer sur l'enveloppe bactérienne grâce à des récepteurs spécifiques. Certaines bactéries possèdent un système plus complexe qui consiste en la production d'une protéine extracellulaire nommée hémophore qui fixe directement l'hème pour ensuite permettre son transport par la bactérie (Krewulak and Vogel, 2008).

La machinerie d'acquisition du fer des bactéries à Gram négatif est organisée de façon similaire pour la reconnaissance et le transport de sidérophores ou de glycoprotéines et d'hémoprotéines de l'hôte (Figure 1.5). Cette machinerie comporte un récepteur Ton-B dépendant situé au niveau de la membrane externe, une protéine de liaison périplasmique (ou PBP: Periplasmic Binding Protein) et un transporteur ABC au niveau de la membrane plasmique (Krewulak and Vogel, 2008). Le récepteur de la transferrine est constitué des protéines TbpB et TbpA (Gray-Owen and Schyvers, 1996). Ce récepteur permet la fixation de la forme ferrée sur la membrane externe de la bactérie puis la dissociation du fer et son import vers le périplasma. De façon équivalente, LbpB et LbpA se fixent à la lactoferrine, puis conduisent à sa dissociation et au transport du Fe^{3+} (Krewulak and Vogel, 2008). Le transport de protéines à hèmes, puis l'acquisition du fer et son transport dans le périplasma requièrent ce même type de transporteur (Krewulak and Vogel, 2008). Une fois dans le périplasma, les ions Fe^{3+} sont pris en charge par des protéines de liaison spécifiques. Par exemple, chez les bactéries à Gram négatif de la famille des *Neisseria* et des *Pasteurellaceae*, la structure de cette protéine périplasmique de liaison au Fe^{3+} nommée FbpA a été déterminée (Shouldice et al., 2003). La protéine FbpA liée à Fe^{3+} est transportée vers le cytoplasme grâce à un transporteur de la membrane interne de type ABC, composé des protéines FbpB et FbpC chez ces deux familles de bactéries.

L'acquisition du fer ferreux est réalisée par le transporteur nommé Ferrous iron transport (Feo), initialement identifié chez *E. coli* K-12 puis retrouvé chez la majorité des espèces bactériennes (Hantke, 1987; Cartron et al., 2006). Chez des mutants incapables d'acquérir le fer ferrique, tels que le mutant *tonB*, l'acquisition des ions Fe^{2+} est intègre et résulte de l'activité Feo (Hantke, 1987). Chez *E. coli*, les trois gènes *feoA*, *feoB* et *feoC* qui codent les protéines constituant ce transporteur sont organisés en un opéron nommé *feoABC* (Hantke, 2003). Chez *Salmonella typhimurium*, contrairement à la souche sauvage, le mutant *feoB* n'est pas capable de coloniser les intestins de souris (Tsolis et al., 1996). En condition anaérobie, cette acquisition du fer ferreux *via* Feo est donc importante pour le cycle de vie de la bactérie. Bien que le mécanisme précis de l'acquisition du Fe^{2+} *via* le système Feo ne soit pas complètement caractérisé, un modèle hypothétique est décrit dans la littérature. En amont du transport du fer par Feo, le Fe^{2+} diffuserait de milieu extérieur vers le périplasma par l'intermédiaire de porines non identifiées (Cartron et al., 2006). Ensuite, le passage du Fe^{2+} vers le cytoplasme serait assuré par la protéine FeoB, localisée au niveau de la membrane

A.



B.

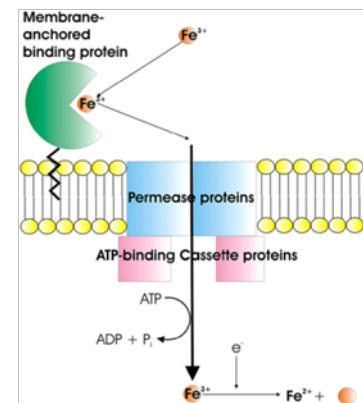


Figure I.5: La machinerie moléculaire d'acquisition du fer des bactéries à Gram négatif (A) et à Gram positif (B).

- A. L'acquisition du fer à partir de la transferrine, des sidérophores et des hèmes débute par la liaison de ces molécules à un récepteur de la membrane externe. Une fois dans le périplasme, les ions Fe^{3+} ou les ferri-sidérophores interagissent avec une protéine de liaison du périplasme (PBP; Periplasmic Binding Protein). Les PBP véhiculent les ions Fe^{3+} ou le ferri-sidérophore jusqu'à un transporteur ABC (ATP-binding Cassette) situé au niveau de la membrane interne et qui permet le passage du fer dans le cytoplasme. Ce transport est dépendant de l'action d'un système Ton-B.
- B. Une protéine ancrée à la membrane plasmique perçoit et fixe les molécules liées au fer comme la transferrine, les sidérophores et des hèmes. Un transporteur ABC est responsable du passage des ions Fe^{3+} et des ferri-sidérophores dans le cytoplasme.

Krewulak *et al.*, 2008.

cytoplasmique, grâce à un transport actif résultant de l'activité GTPase du domaine N-terminal cytoplasmique de FeoB (Marlovits et al., 2002). FeoA et FeoC sont nécessaires à l'activité de FeoB mais leur rôle exact n'est pas connu (Lau et al., 2013).

Concernant les bactéries à Gram positif, en dehors des systèmes sidérophores, il existe peu de données moléculaires relatives à l'acquisition du fer et à son transport. Ce qui est connu, c'est l'existence d'une protéine ancrée à la membrane, ressemblant aux protéines PBP des bactéries à Gram négatif, qui permettent la liaison des glycoprotéines de transport du fer, des hèmes ou hémoprotéines de l'hôte (Figure 1.5) (Krewulak and Vogel, 2008). D'autre part, Mazmanian et ses collaborateurs ont montré la présence de transporteurs membranaires de type ABC impliqués dans l'import de l'hème vers le cytoplasme chez *S. aureus* (Mazmanian et al., 2003).

1.3.2. Chez les champignons

Les champignons possèdent différents systèmes d'acquisition du fer pouvant coexister au sein d'une même espèce. L'acquisition à haute affinité est réalisée par des sidérophores ou *via* l'assimilation par réduction du fer ou RIA (Reductive Iron Assimilation) (Canessa and Larrondo, 2012). La RIA se réalise en deux étapes : des réductases ferriques localisées au niveau de la membrane plasmique interviennent pour réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , puis un complexe protéique transporte le Fe^{2+} vers le cytoplasme (Canessa and Larrondo, 2012). Chez *S. cerevisiae* il existe les metalloréductases Fre1p, Fre2p, Fre3p et Fre4p qui accomplissent la première étape de réduction (Yun, 2000). Parmi les substrats de la RIA se trouvent par exemple des sidérophores, du fer-citrate ou encore des sels contenant du fer. Une fois réduit, le Fe^{2+} est pris en charge par un complexe à haute affinité afin d'entrer dans la cellule (Canessa and Larrondo, 2012). Ce complexe est constitué d'une ferroxidase et d'une perméase permettant successivement l'oxydation du fer puis son passage à travers la membrane plasmique. Chez *S. cerevisiae*, ces fonctions sont remplies par la ferroxidase Fet3p et la perméase Ftr1p (Kwok et al., 2006). On peut également noter qu'un système d'acquisition du fer Fe^{2+} à faible affinité a été identifié chez *S. cerevisiae*. Ainsi, la protéine Fet4p permet le transport direct de plusieurs métaux comprenant le Fe^{2+} (Dix et al., 1994).

Les champignons ont la capacité de fixer les hèmes et de les transporter directement les hèmes (Canessa and Larrondo, 2012). Bien que le mécanisme moléculaire permettant cette assimilation soit assez peu compris, divers acteurs ont été décrits. Par exemple, chez *C. albicans*, la protéine Rbt5p, une protéine ancrée à la membrane plasmique *via* un glycosylphosphatidylinositol (ancre GPI), assure la liaison à l'hème dans le milieu extracellulaire, et la protéine de type hème oxygénase du réticulum

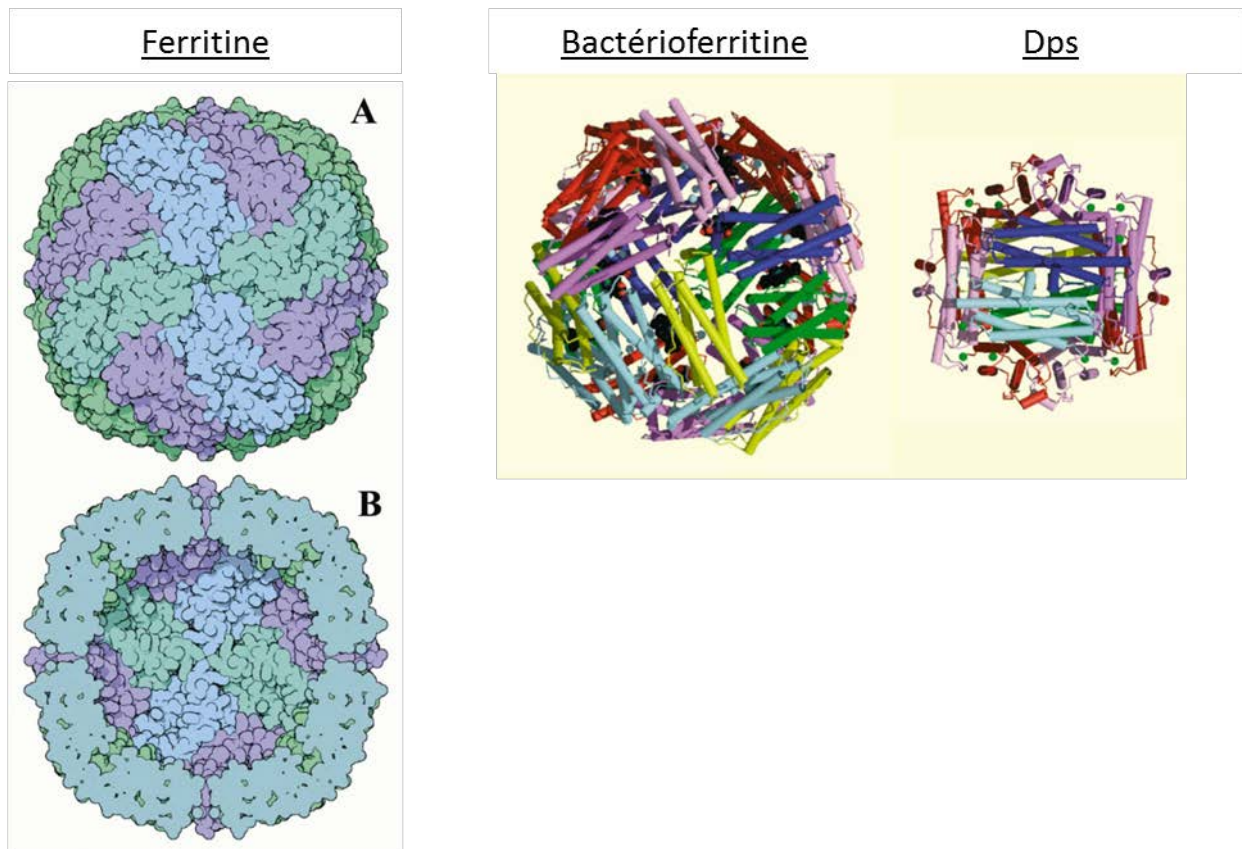


Figure I.6: Le stockage du fer chez les bactéries est assuré par les ferritines, les bactéroferritines et les Dps .

Représentation des structures des protéines ferritine, bactéroferritine et Dps de *E. coli* en projection 3D.

La ferritine est une protéine constituée de 24 sous-unités et qui permet le stockage du fer, jusqu'à 3000 atomes, dans son centre. A. Projection 3D de l'extérieur de la ferritine; B. Projection 3D de l'intérieur de la ferritine.

La bactéroferritine est une protéine constituée de 24 sous-unités. Cette protéine stocke le fer grâce aux 12 hèmes qui la composent.

La protéine Dps, ou miniferritine, est une protéine constituée de 12 sous-unités. Cette protéine stocke jusqu'à 500 atomes de fer au centre de la molécule.

Modifié d'après Andrews *et al.*, 2003.

endoplasmique Hmx1p permettrait la libération intracellulaire du fer de l'hème (de Groot et al., 2003; Santos, 2003).

1.4. Le stockage du fer chez les microorganismes

1.4.1. Le stockage du fer chez les bactéries

Chez les bactéries, trois types de protéines responsables du stockage du fer cytoplasmique ont été décrites : les protéines Dps ou miniferritines, les ferritines et les bactérioferritines (Figure I.6).

Les ferritines, qui sont également présentes chez les eucaryotes, ont été identifiées chez les bactéries. Ces protéines sont constituées de 24 sous-unités et permettent de stocker jusqu'à 3000 atomes de cet élément. Lors de la phase de croissance exponentielle de la bactérie *E. coli*, la protéine FtnA, codée par le gène *ftnA*, stocke l'excédent de fer dans la bactérie (Abdul-Tehrani et al., 1999).

Les bactérioferritines (Bfr), qui assurent le stockage du fer cytoplasmique, sont des protéines de 500 kDa organisées en 24 sous-unités qui comportent au total 12 hèmes. Cependant, des variants sans hèmes ont été identifiés chez *E. coli* (Le Brun, 1995). Les gènes *bfr*, codant les bactérioferritines sont souvent associés aux gènes *bfd* qui eux codent des ferrédoxines associées aux bactérioferritines (Bfd). Il semblerait que les bactérioferritines et ferrédoxines associées interagissent de sorte qu'en condition de carence en fer la Bfd, grâce à ses propriétés redox réduirait la Bfr afin de libérer et rendre disponible le fer stocké par les bactérioferritines (Quail et al., 1996).

Expert et al. ont montré que 5% du fer de *D. dadantii* est contenu dans les bactérioferritines et 1% est stocké grâce aux protéines Dps (Expert et al., 2008). Les gènes codant ces protéines sont régulés transcriptionnellement par le régulateur Fur (Ferric uptake regulator) (Cf. 1.5.1.).

Les Dps, ou miniferritines, sont de petites protéines de 250 kDa qui ont été identifiées chez *E. coli* et sont présentes uniquement chez les procaryotes. Une protéine Dps est constituée de 12 sous unités Dps et peut stocker du fer à hauteur de 500 atomes de fer par sous-unités (Andrews et al., 2003). La fonction biologique des protéines Dps est la protection de l'ADN contre les dommages causés par le stress oxydatif, notamment lié à la présence de fer dans la cellule (Almiron et al., 1992). De ce fait, bien que ces protéines participent au stockage du fer intracellulaire, ce n'est pas leur fonction première (Zhao, 2002).

1.4.2. Le stockage du fer chez les champignons

Selon les espèces de champignon, le fer peut être stocké dans le compartiment vacuolaire ou bien par liaison à des sidérophores cytoplasmiques.

Dans la vacuole de *S. cerevisiae*, les ions Fe^{3+} sont majoritairement liés à des polyphosphates (Cockrell et al., 2011). Le transporteur Ccc1p permet l'entrée du fer cytoplasmique dans la vacuole, alors que l'export du fer de la vacuole vers le cytoplasme dépend de la protéine Snf1p et du complexe Fet5p-Fth1p (Urbanowski, 1999; Li, 2001). Le stockage du fer vacuolaire n'est pas présent chez tous les champignons et n'est pas incompatible avec un stockage cytoplasmique par des sidérophores.

Chez *Aspergillus nidulans*, le sidérophore ferricrocine intervient dans le stockage du fer des conidies. En condition de carence ferrique, l'absence de biosynthèse de la ferricrocine dans les conidies chez le mutant Δsidc provoque un retard de germination de ces dernières. En revanche, lors d'un excès de fer, la ferricrocine s'accumule dans les conidies. Ces résultats illustrent le rôle de ce sidérophore dans le stockage du fer intracellulaire (Eisendle et al., 2006).

1.5. La régulation du métabolisme du fer

1.5.1. Le régulation du métabolisme du fer chez les bactéries

Le métabolisme du fer des bactéries est sous le contrôle de régulateurs négatifs et positifs. Parmi ces régulateurs, le facteur de transcription Fur pour Ferric Uptake Regulation est le plus étudié. Fur est présent chez les bactéries à Gram négatif et chez les bactéries à Gram positif ayant un faible contenu en GC. Initialement, le gène *fur* a été identifié grâce à l'étude de mutants d'*E. coli* présentant une expression constitutive des gènes d'acquisition du fer (Bagg and Neilands, 1985). Le régulateur Fur réprime l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du fer, tels que des gènes de biosynthèse et d'acquisition des sidérophores, et active l'expression des gènes codant les ferritines bactériennes ainsi que des gènes codant des enzymes de détoxification des FAO. Par exemple chez la souche K-12 d'*E. coli*, McHugh et ses collaborateurs ont mis en évidence que Fur contrôle directement ou indirectement l'expression de 101 gènes (McHugh et al., 2003). Ces gènes ne sont pas tous impliqués dans le métabolisme du fer, faisant ainsi de Fur un régulateur plus généralement impliqué dans la régulation de l'adaptation du métabolisme d'*E. coli* à l'environnement.

Selon le statut en fer de la bactérie, la protéine Fur est présente sous la forme d'un monomère lorsqu'il n'y a pas de fer dans la cellule ou d'un homodimère si le fer est en quantité suffisante dans

la cellule (Troxell and Hassan, 2013). En effet, Fur possède un site de liaison à Fe^{2+} constitué de 5 acides aminés dans sa région C-terminale. L'homodimère de Fur formé en présence des ions Fe^{2+} régule l'expression des gènes qu'il contrôle. Chez *E. coli*, une séquence inversée et répétée spécifique de 19 paires de bases a été trouvée dans les régions promotrices de 90 gènes régulés par Fur : cette séquence est une boîte Fur permettant la liaison de Fe^{2+} -Fur (Escolar et al., 1999).

Le régulateur Fur a été principalement étudié pour la répression qu'il exerce sur des gènes de réponse à la carence en fer en condition non limitante de fer, et afin de prévenir un excès de fer cytotoxique (Figure I.7). Par exemple, il a été montré que Fur se fixe au promoteur du gène *acsF* de *D. dadantii*, un gène impliqué dans la biosynthèse du sidérophore achromobactine, de façon à réprimer son expression lorsque le fer est en quantité suffisante dans la cellule (Franza et al., 2005). La régulation négative des cibles de Fur résulte principalement d'une compétition avec l'ARN polymérase (Figure I.7A).

Fur régule l'expression des gènes qu'il contrôle positivement selon trois des modèles indirects. Le modèle majoritaire décrit une régulation négative Fur-dépendante de gènes codant de petits ARN, eux-mêmes nécessaires à la régulation négative de gènes codant des protéines à cofacteur fer (Figure I.7B) (Troxell and Hassan, 2013). En effet, en condition limitante de fer, la transcription du gène *RyhB* permet la synthèse des petits ARN *RyhB* qui s'hybrident sur les transcrits de gènes de réponse aux ions Fe^{2+} . L'hybridation des transcrits *RyhB* aux transcrits des gènes cibles empêche alors la biosynthèse des protéines qu'ils codent. Parmi les gènes cibles, *sodB* et *bfr* chez *E. coli*, sont régulés par *rhyB*. Leurs transcrits sont accumulés en présence de fer (Massé and Gottesman, 2002). De ce fait, lorsque le fer est présent dans la cellule, le stockage du fer par les Bfr limite la production de FAO et SodB permet une meilleure détoxification des FAO dans la cellule (Massé and Gottesman, 2002).

Un second modèle d'activation transcriptionnelle *via* Fur propose que la liaison de Fe^{2+} -Fur à la boîte Fur du gène cible facilite le recrutement du complexe ARN polymérase (Figure I.7D). Ce mécanisme a été observé pour l'activation transcriptionnelle du gène *norB* (pour nitric-oxide reductase) d'*Helicobacter pylori* et du gène *hilD* (codant un facteur de transcription) de *S. typhimurium* (Delany et al., 2004; Teixidó et al., 2011). Ces exemples d'activation directe de Fur sont rares et peu décrits. Un troisième modèle consiste en un mécanisme d'anti-répression dans lequel la boîte de fixation de Fur chevauche des boîtes fixant d'autres régulateurs (Figure I.7C) (Nandal et al., 2009).

Chez les bactéries à Gram positif à haut contenu en GC qui ne possèdent pas le régulateur Fur, DtxR pour Diphtheria toxin regulator est le régulateur le plus répandu (Wakeman and Skaar, 2012). DtxR active l'expression de gènes de réponse à la carence en fer chez les *Streptomyces*, *Corynebacteria* et

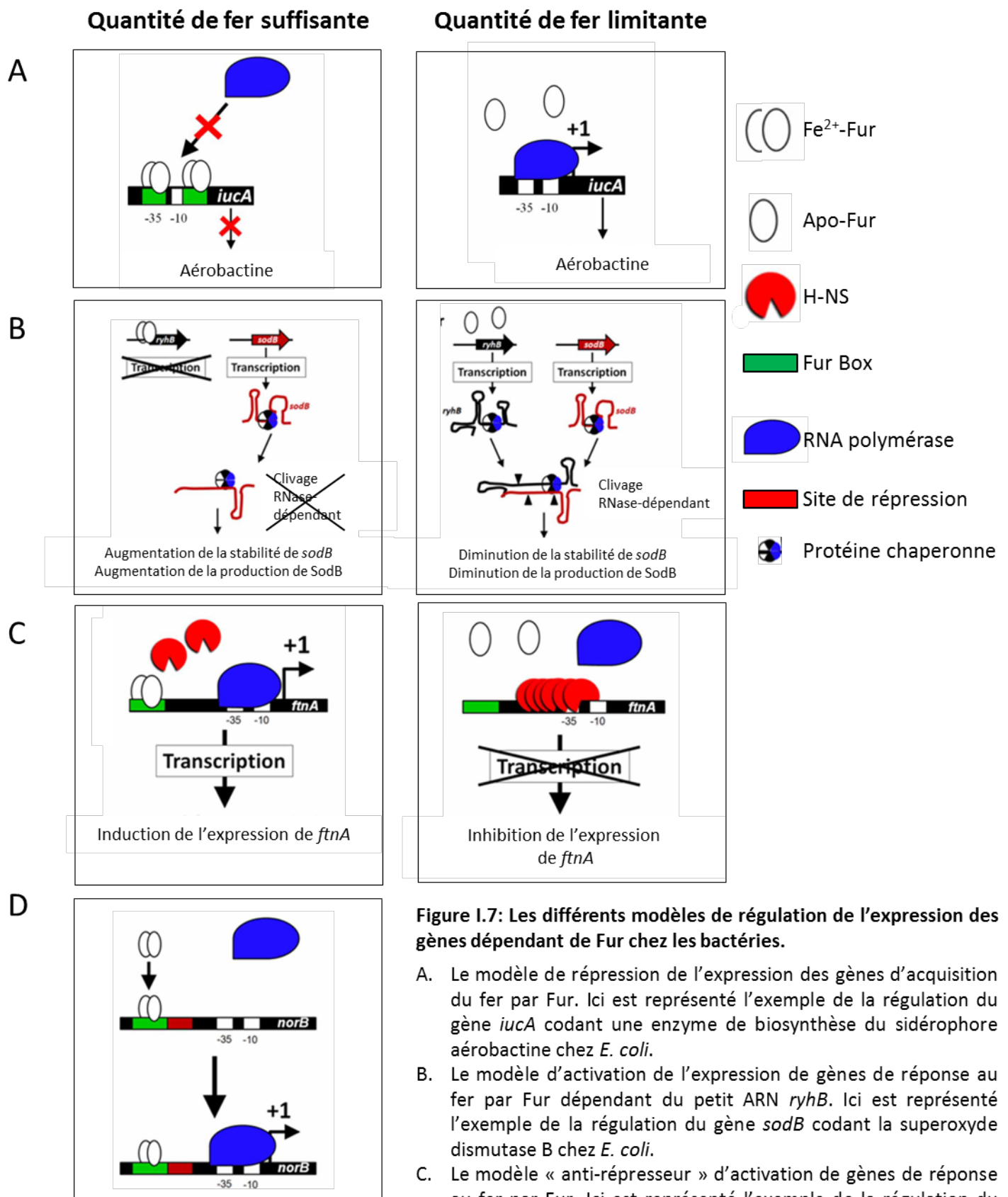


Figure I.7: Les différents modèles de régulation de l'expression des gènes dépendant de Fur chez les bactéries.

- Le modèle de répression de l'expression des gènes d'acquisition du fer par Fur. Ici est représenté l'exemple de la régulation du gène *iucA* codant une enzyme de biosynthèse du sidérophore aérobactine chez *E. coli*.
- Le modèle d'activation de l'expression de gènes de réponse au fer par Fur dépendant du petit ARN *ryhB*. Ici est représenté l'exemple de la régulation du gène *sodB* codant la superoxyde dismutase B chez *E. coli*.
- Le modèle « anti-répresseur » d'activation de gènes de réponse au fer par Fur. Ici est représenté l'exemple de la régulation du gène *ftnA* codant la ferritine A chez *E. coli*.
- Le modèle d'activation de l'expression de gènes de réponse au fer par Fur par recrutement de l'ARN polymérase. Ici est représenté l'exemple de la régulation du gène *norB* codant une protéine conférant une protection à *H. pylori* contre le NO.

Modifié d'après Troxell and Hassan, 2013.

Mycobacteria (Wakeman and Skaar, 2012). DtxR est un régulateur global du métabolisme, dont le fonctionnement est similaire au régulateur, qui dépend de la présence de fer intracellulaire.

En plus des régulateurs du métabolisme du fer précédemment décrits, il existe d'autres régulateurs chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, tels que des facteurs sigma alternatifs, qui peuvent réguler la réponse des bactéries à la disponibilité en fer (Miethke and Marahiel, 2007). Les facteurs sigma alternatifs sont des protéines faisant partie des complexes d'ARN polymérase et intégrant des signaux extérieurs permettant ainsi de réguler l'expression des gènes.

1.5.2. La régulation du métabolisme du fer chez les champignons

Chez les champignons, deux stratégies principales gouvernant la régulation du métabolisme du fer ont été décrites (Haas et al., 2008). Lorsque le fer est en quantité non limitante pour l'organisme, la première stratégie permet la répression des réponses à la carence en fer du champignon par les Iron-Responsive GATA Factor (IRGF), et la seconde repose sur l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la gestion de la carence en fer par le facteur de transcription Aft1, le senseur du fer chez *S. cerevisiae* (Figure I.8) (Haas et al., 2008).

La plupart des champignons utilisent les facteurs IRGF pour réprimer l'expression des gènes du métabolisme du fer dans les cellules carencées en fer (Haas et al., 2008). Les IRGF sont des facteurs de transcription à doigt de zinc de la famille des facteurs GATA, qui reconnaissent spécifiquement des séquences GATA (Haas et al., 2008). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, le gène *fep1*, qui code un IRGF, est constitutivement exprimé (Pelletier et al., 2002). En condition de carence ferrique, Php4 réprime les gènes impliqués dans les voies métaboliques consommatrices de fer. Quand le fer est en quantité suffisante dans la cellule, l'IRGF Fep1 réprime l'expression du gène *php4* et permet l'expression du métabolisme consommateur de fer, tel que la respiration ou la biosynthèse des hèmes (Haas et al., 2008).

Aft1 est un activateur transcriptionnel qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez des espèces du genre *Saccharomyces* (Haas et al., 2008). Lorsque la quantité de fer disponible pour la cellule diminue, Aft1, qui est produit constitutivement, est dirigé vers le noyau où la protéine s'accumule et active ces cibles (Ueta et al., 2007). Parmi les cibles se trouvent des gènes impliqués dans l'acquisition du fer via la RIA ou les sidérophores ou encore dans le stockage du fer vacuolaire (Haas et al., 2008). Le gène codant Cth2 est également sous le contrôle d'Aft1. Cth2 est une protéine qui déstabilise les transcrits codant des protéines responsables de la

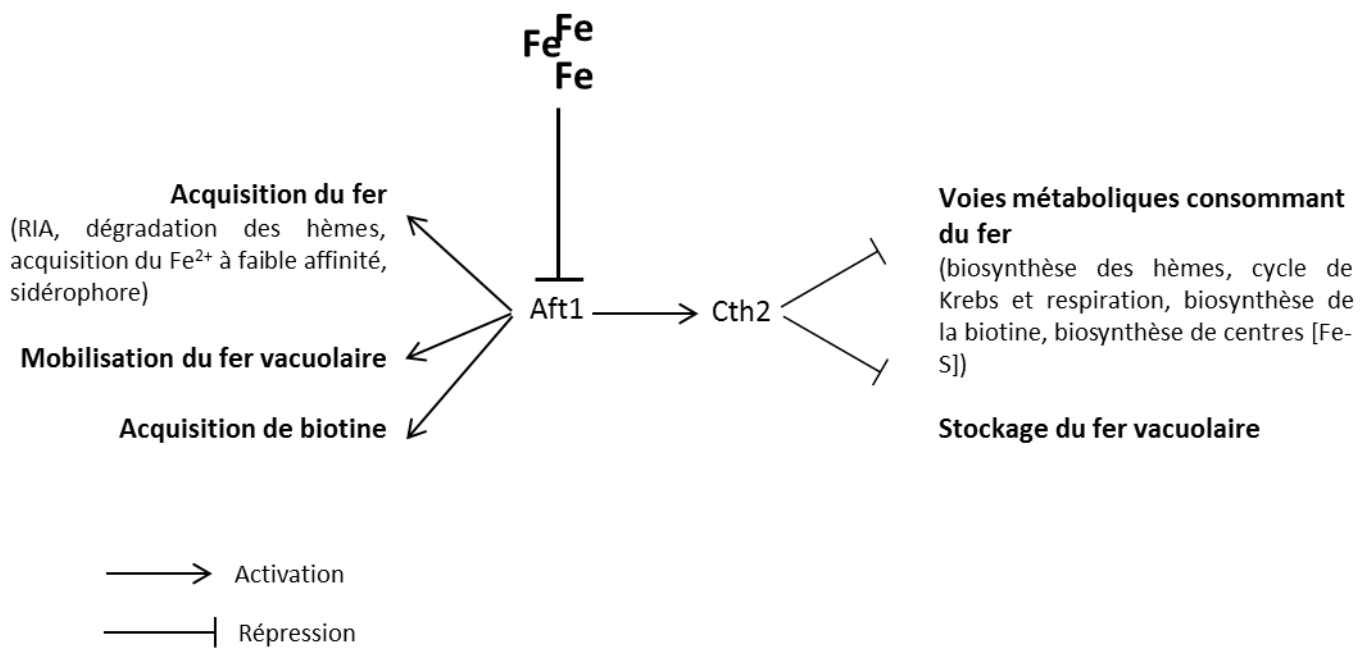


Figure I.8: Le modèle de régulation de l'expression des gènes dépendant de Aft1 chez *S. cerevisiae*.

Modifié d'après Haas *et al.*, 2008.

biosynthèse de cluster Fe-S, de la respiration mitochondriale et plus généralement des processus cellulaires consommateur de fer (Puig et al., 2005).

1.6. Le couplage entre le fer et la pathogénie chez les bactéries et les champignons pathogènes

Chez certaines bactéries et champignons pathogènes, il existe un lien entre le métabolisme du fer et la pathogénie. Plusieurs études ont montré que Fur, régulateur majeur du métabolisme du fer bactérien, est impliqué dans la régulation de facteurs de pathogénie. La plupart de ces études s'appuient sur l'évaluation de la pathogénie de souches bactériennes sauvages ou mutantes pour Fur. Ainsi, chez les bactéries du genre *Shigella* responsables de la dysenterie, Fur promeut indirectement l'expression des gènes *ipa*, *mxi*, *spa* et *vir*, codant une invasine, des protéine nécessaires au système de sécrétion de type III (SST3) et à la propagation cellulaire, *via* la régulation négative de *RyhB* (Payne et al., 2006). De façon similaire, Fur est nécessaire à l'activation du facteur de virulence *HilA*, régulateur positif du système de sécrétion de type trois SPI-1 chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lors de la carence en fer (Troxell et al., 2010). De même, les mutants *fur* de *S. aureus* présentent une diminution de la pathogénie liée à l'absence d'activation de gènes de pathogénie par le régulateur Fur, tels que les gènes codant des cytolysines et des hémolysines (Torres et al., 2010). De plus, chez cette bactérie et chez *Streptococcus pneumoniae*, il a été montré que la formation de biofilm est dépendante de Fur lorsque la bactérie manque de fer (Johnson et al., 2005; Johnson et al., 2008). Chez le champignon pathogène des mammifères *Cryptococcus neoformans*, la délétion du régulateur de la réponse en fer *Cir1* ou l'absence de *Cft1* nécessaire à l'assimilation du fer, provoquent une diminution de la pathogénie (Jung et al., 2006). La bactérie phytopathogène *D. dadantii* possède une batterie d'enzymes pectinolytiques qui provoque les symptômes de pourriture molle sur plante hôte. L'expression des gènes *PeID* et *PeIE*, codant des pectates lyases, est activés lorsque le milieu environnant la bactérie est pauvre en fer et ce par l'intermédiaire de Fur (Franza et al., 1999).

D'autres éléments relatifs à l'acquisition ou au stockage du fer par les microorganismes sont importants pour la pathogénie. Par exemple, la synthèse du sidérophore pyoverdine est nécessaire à l'activation de facteurs de pathogénie et à la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* (Wilderman et al., 2001). Chez *D. dadantii*, il a été mis en évidence un rôle de la ferritine A dans la pathogénie sur

endive et saintpaulia et des bactéroferritines dans la pathogénie sur endive (Boughammoura et al., 2007).

2. Le métabolisme du fer chez les plantes

2.1. Les besoins en fer chez les végétaux et les répercussions d'une carence physiologique

Comme cela a été mentionné précédemment, les propriétés d'échangeur d'électrons du fer implique qu'il joue un rôle crucial dans diverses réactions biochimiques vitales. Il est important de souligner que, chez les végétaux, la photosynthèse est dépendante de la présence de fer pour les échanges d'électrons. Ainsi, la ferrédoxine, une protéine à centre [Fe-S], permet le transfert final d'électron dans le complexe photosynthétique I (Crichton, 2002).

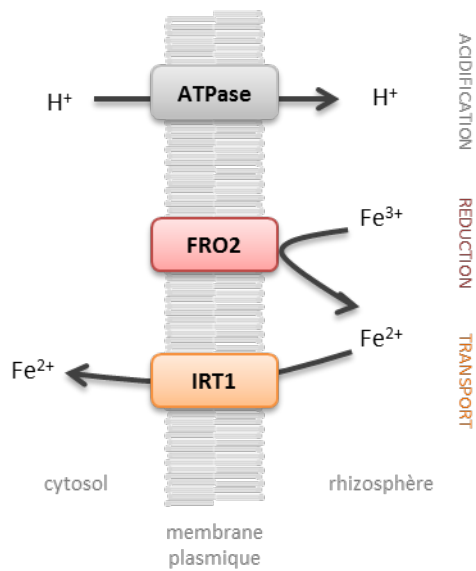
De ce fait, lorsque les végétaux manquent de fer pour assurer leurs besoins métaboliques, la croissance globale de l'organisme est ralentie voire arrêtée et des chloroses internervaires apparaissent sur les feuilles les plus jeunes (Marschner and Marschner, 2012). Au niveau racinaire, la surface d'absorption est augmentée par la formation d'un plus grand nombre de racines latérales hautement ramifiées et un accroissement de la pointe racinaire (Müller and Schmidt, 2004). Ce manque de fer produit également une modification du contenu pigmentaire en chlorophylle et les caroténoïdes, qui requièrent des protéines à fer pour leur synthèse, et une reprogrammation métabolique afin de remédier à cette situation critique (Vigani et al., 2013).

L'apport en fer de la nutrition animale, et humaine, repose sur l'alimentation issue de produits végétaux. Une carence de cet élément impacte donc la quantité de biomasse végétale produite, mais aussi la qualité de cette production et se répercute sur l'alimentation humaine et animale. La compréhension des mécanismes qui régulent l'homéostasie du fer chez les plantes est un atout essentiel pour l'amélioration de la production végétale.

2.2. Les différentes stratégies d'acquisition du fer chez les Angiospermes

Depuis les années 1990, la majorité des gènes caractérisés pour leur fonction dans l'acquisition du fer correspondent et entrent dans le modèle décrit par Römheld et Marschner. Ce modèle classe les

Stratégie I d'acquisition du fer



Stratégie II d'acquisition du fer

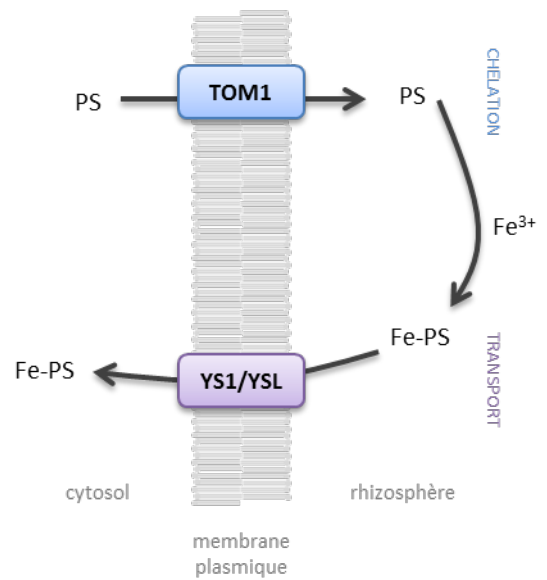


Figure I.9: Les différentes stratégies d'acquisition du fer chez les Angiospermes.

Angiospermes en deux groupes selon leur stratégie d'acquisition du fer : la stratégie I et la stratégie II (Figure I.9) (Römheld and Marschner, 1986).

Les plantes dicotylédones et monocotylédones non poacées acquièrent le fer *via* la stratégie I. Cette acquisition se réalise en trois étapes : i) acidification, ii) réduction, iii) transport. Lors de la première étape, des protons ou des composés phénoliques sont excrétés à partir de l'épiderme racinaire vers la rhizosphère afin de solubiliser les complexes Fe^{3+} (Rodriguez-Celma et al., 2013). Le Fe^{3+} sous forme dissoute est alors accessible par les réductases ferriques de la racine qui interviennent pour le réduire en Fe^{2+} . C'est cette forme Fe^{2+} qui est prise en charge par les transporteurs de l'épiderme racinaire et qui permet l'acquisition du fer par la plante. Chez différentes espèces végétales (arabidopsis, tabac, soja), il a été montré que l'étape de réduction est limitante car la sur-expression du gène codant la réductase ferrique augmente la tolérance de ces plantes à la limitation en fer (Hindt and Guerinot, 2012).

Chez *A. thaliana*, les acteurs moléculaires de l'acquisition du fer répondent au schéma de la stratégie I. L'étape d'acidification de la rhizosphère permettant la dissolution des complexes de Fe^{3+} met en œuvre une pompe à proton de type H^+ -ATPase nommée AHA2. AHA2 appartient à la famille des AHA et est localisée au niveau de la membrane plasmique. Bien que l'expression de plusieurs AHA soit induite dans les racines lors d'une carence en fer, des études de mutants de perte de fonction ont mis en évidence que la protéine AHA2 est le principal acteur de l'acidification de la rhizosphère (Santi and Schmidt, 2009). Le Fe^{3+} est dissout et disponible pour la réduction en Fe^{2+} par l'action de l'enzyme FRO2 (Ferric Reductase Oxidase 2), une réductase ferrique membranaire (Robinson et al., 1999). Le transport du fer réduit dans les cellules d'épiderme racinaire est ensuite effectué par la protéine IRT1 (Iron Regulated Transporter 1) le transporteur spécifique des cations divalents Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Co^{2+} (Eide et al., 1996; Korshunova et al., 1999; Vert, 2002). Il a été montré que l'activité réductase ferrique n'est effective qu'en présence de fer dans le milieu. En effet, si la rhizosphère est totalement dépourvue de fer, ce système d'acquisition n'est pas induit, mais si des traces de fer sont présentes dans le milieu, l'induction de l'expression des gènes et de l'activité protéique de FRO2 et IRT1 sont observées (Schikora and Schmidt, 2001; Vert, 2003). Cette perte d'induction en absence totale de fer est interprétée comme un système d'économie d'énergie de la plante.

En condition limitante de fer les plantes de la famille des Poacées, qui acquièrent le fer par la stratégie dite II, emploient des phytosidérophores. Les phytosidérophores sont des acides muginéiques de différentes sortes sécrétés dans la rhizosphère, chélatant les ions Fe^{3+} , puis transportés dans les cellules de l'épiderme racinaire sous forme de complexe Fe-phytosydérophore

(Fe-PS). La biosynthèse de phytosidérophores est réalisée à partir de la S-adenosyl-L-méthionine, suite à trois réactions enzymatiques successives. La biosynthèse d'acide 2'-désoxymuginéique (DMA), le précurseur des acides muginéiques, fait intervenir la nicotianamine synthétase (NAS) produisant la nicotianamine, puis la nicotianamine amino-transférase (NAAT) et enfin l'acide désoxy-muginéique synthétase (DMAS) (Kobayashi and Nishizawa, 2012). Les acteurs moléculaires participant à la sécrétion des phytosidérophores sont, eux, moins connus. Néanmoins on sait que les enzymes de synthèses NAS et NAAT sont situées respectivement au niveau des membranes et à l'intérieur de vésicules de transport, et que les phytosidérophores sont principalement sécrétés dans la rhizosphère en début de journée (Kobayashi and Nishizawa, 2012). Récemment, les transporteurs impliqués dans l'excrétion des phytosidérophores vers la rhizosphère ont été identifiés chez le riz et l'orge, TOM1 et HvTOM1 respectivement pour Transporter Of Mugineic acid family phytosiderophore 1 (Nozoye et al., 2010). Une fois le complexe Fe-PS formé dans le sol, ce dernier est pris en charge par des transporteurs de la famille YSL (YellowStripe 1/ YellowStripe 1-like (YS1/YSL)) permettant son intégration dans la cellule de racine (Curie et al., 2001; Kobayashi and Nishizawa, 2012).

Le riz est un cas particulier car il possède dans sa machinerie d'acquisition du fer des composantes de la stratégie I et de la stratégie II (Ishimaru et al., 2006). Chez cette plante, qui utilise principalement la stratégie II, un transporteur du fer Fe^{2+} nommé OsIRT1 a été identifié et est impliqué dans l'acquisition du fer via la stratégie I (Ishimaru et al., 2006). Il est intéressant de noter que l'activité réductase ferrique permettant la réduction du fer est très faible (Ishimaru et al., 2006). Dans les rizières, lorsque le sol est inondé, la forme Fe^{2+} du fer est abondante et le transport direct par OsIRT1 pourrait conférer un avantage à la plante dans ces conditions d'anaérobie (Ishimaru et al., 2006).

2.3. La circulation et le stockage du fer dans la plante

Le fer étant très peu soluble et prompt à favoriser les échanges d'électrons, qui peuvent être une source de FAO, sa circulation au sein de la plante ne peut se faire librement. Ainsi, pour assurer sa solubilité tout en évitant les oxydations, le fer doit être associé à des ligands spécifiques qui permettent sa circulation dans la plante (Figure I.10). Actuellement, trois chélateurs principaux ont été identifiés: le citrate, la nicotianamine (NA) et les acides muginéiques (MA).

2.3.1. La circulation du fer dans la plante

Le citrate est un acide organique, présent dans le xylème, supposé apte à la chélation et au transport du fer (Tiffin, 1966; White et al., 1981). Chez la tomate la forme complexée tri-Fe (III) tri-citrate circulante a été récemment identifiée (Rellan-Alvarez et al., 2009). Chez *A. thaliana*, la protéine FRD3 (Ferric Reductase Defective 3), de la famille des transporteurs MATE (Multidrug And Toxin Efflux), est le transporteur du citrate, comme cela a été démontré chez des oocytes de *X. laevis* (Durrett et al., 2007). Bien que la quantité de fer totale présente dans le mutant *frd3* soit similaire à celle présente chez la plante sauvage, ce mutant présente des symptômes de carence en fer se traduisant par un phénotype chlorotique et une activation permanente du système d'acquisition du fer (Rogers, 2002). Cette apparente contradiction a été résolue en observant la localisation tissulaire du fer de *frd3* où celui-ci est restreint au cylindre vasculaire central racinaire n'alimentant pas les parties aérienne en fer (Green, 2004). FRD3 assure donc le chargement en fer du xylème grâce à sa fonction de transporteur d'efflux du citrate (Figure I.10). A travers la littérature, l'hypothèse selon laquelle FRD3 serait un transporteur de Fe-citrate est souvent avancée bien qu'aucune expérience n'ait pu le démontrer à l'heure actuelle.

Chez le riz, le gène *OsFRDL1* (FRD3-Like), similaire au gène *FRD3* d'*A. thaliana*, code un transporteur de citrate et participe à la circulation du fer dans la plante. Chez des lignées dépourvues de ce transporteur, les symptômes drastiques de carence ferrique constatés chez le mutant *frd3* ne sont pas observés, suggérant la présence d'autres transporteurs d'efflux du fer du xylème chez le riz (Yokosho et al., 2008).

La nicotianamine (NA) est un acide aminé non protéinogène, précurseur des acides muginéiques chez les Poacées, identifié chez le tabac et présente chez tous les végétaux, y compris les plantes non poacées (Noma and Noguchi, 1976; Noma et al., 1971). Il a été montré que la NA a des propriétés de liaison aux métaux et il est fortement suggéré dans la littérature que cet acide aminé se lie au fer dans l'appareil vasculaire, notamment dans le phloème, pour maintenir le fer sous une forme soluble et circulante (Benès et al., 1983; von Wirén et al., 1999). Chez la tomate, l'étude du mutant spontané *chloronerva*, qui présente une forte chlorose internervaire, a permis d'attribuer ce phénotype à l'absence de la forme fonctionnelle de la NA synthétase (NAS1) (Ling et al., 1999). Bien que ce mutant présente de sévères chloroses sur les jeunes feuilles, la machinerie moléculaire d'acquisition du fer est constitutivement active et le mutant accumule plus de fer que la plante sauvage (Pich et al., 1994). Il est important de noter que ces phénotypes sont supprimés par l'application exogène de NA (Curie et al., 2008). C'est chez le maïs qu'a été identifié le premier transporteur de la NA; Yellow Stripe 1 (YS1) est un importeur des complexes Fe-MA et aussi Zn, Cu ou Ni, présent au niveau racinaire (Figure I.10) (Curie et al., 2001; Schaaf, 2004). Chez *Arabidopsis*, bien qu'il n'y ait pas de

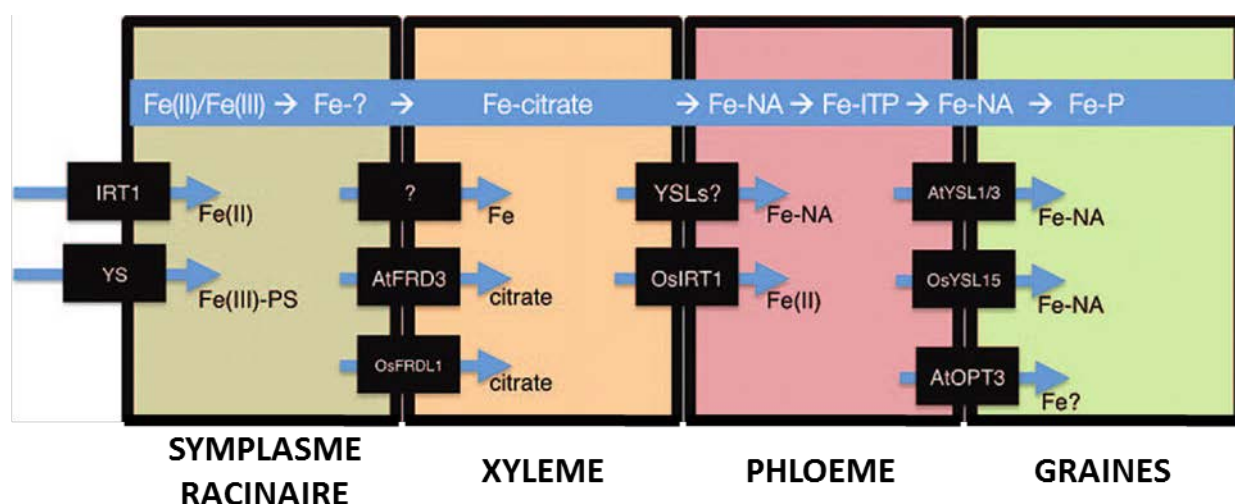


Figure I.10: Schéma hypothétique du transport longue distance du fer chez les plantes.

Une fois transporté dans les cellules de l'épiderme racinaire *via* les transporteurs IRT1 ou YS, le fer est très probablement chélaté, bien que cette chélation n'ait pas été démontrée formellement par des résultats expérimentaux. Bien que le transporteur responsable du chargement du fer dans le xylème ne soit pas formellement identifié, la chélation du fer par le citrate dans le xylème a été démontrée. Néanmoins, il a été montré que FRD3 transporte le citrate dans le xylème. Chez le riz, les transporteurs YSL pourraient assurer le transport du fer dans le phloème, où le fer est lié à la nicotianamine (NA). Un des rôles supposés du NA est d'assurer le transfert du fer entre les transporteurs YSL et les protéines de transport de fer (ITP: Iron Transport Protein). La NA est essentielle dans la circulation du fer longue distance pour le chargement du fer dans les graines, bien que le ligand responsable de la chélation du fer dans la graine ne soit pas formellement identifié. Les mutants *ys1*, *ys3* et *opt3* ont des contenus en fer moins importants que la plante sauvage, ce qui indique que les protéines codées par les gènes correspondants seraient impliquées dans le chargement en fer des graines.

Modifié d'après Morrissey et Gueriot, 2009

synthèse d'acide muginéique, il existe huit gènes *YS-Like* (*YSL*) qui ont suscité l'intérêt d'équipes travaillant sur le transport à longue distance du fer dans la plante. Par exemple, il existe une corrélation entre la diminution de l'expression du gène *YSL2* et le manque de Fe ou de Zn (Schaaf, 2005). Ce gène s'exprimant dans les parenchymes vasculaires, le péricycle et l'endoderme racinaires et dans les nervures de la feuille, la protéine *YSL2* pourrait contribuer aux échanges de fer vasculaires (Schaaf, 2005). Alors que dans une première étude il a été montré que l'expression d'*AtYSL2* complémente le phénotype du mutant *fet3fet4* de transport du fer chez la levure, une seconde étude n'a pas mis en évidence un tel transport du fer par *AtYSL2* exprimé sous la dépendance de plusieurs promoteurs (DiDonato et al., 2004; Schaaf, 2005). Il existe donc des résultats contradictoires quant à la capacité d'*AtYSL2* à compléter des mutants de levure de transport du fer, plutôt défavorable au rôle de transporteur du fer par *YSL2* (DiDonato et al., 2004; Schaaf, 2005). Pour les gènes *AtYSL1* et *AtYSL3*, il a été observé que leur niveau d'expression augmente lorsque la quantité de fer apportée à la plante augmente. Ces gènes partagent un patron d'expression vasculaire majoritairement foliaire et floral, bien qu'*AtYSL3* soit également exprimé dans les racines et très fortement dans le pollen (Jean et al., 2005; Waters et al., 2006). L'étude des simples mutants de chacun de ces gènes n'a pas révélé de phénotype fort alors que le double mutant *ysl1ysl3* est fortement perturbé, contient peu de fer et présente une chlorose internervaire. Ce phénotype peut être compensé par une addition de fer au milieu de culture, suggérant fortement un rôle de ces protéines dans le transport du fer depuis le système vasculaire vers les organes puits tels que les graines (Waters et al., 2006; Curie et al., 2008). Ces résultats sont confortés par diverses données d'expression prédisant une implication de ces gènes lors de la sénescence. Parallèlement, des études chez le riz ont montré que les gènes *OsYSL2*, *OsYSL13* et *OsYSL14* possèdent un patron d'expression foliaire, laissant envisager une fonction dans le transport des métaux et donc du fer (Koike et al., 2004; Murata et al., 2006).

Le transport du fer *via* le phloème conditionne l'apport en fer des organes puits tels que les graines et se trouve donc être un processus clef. Dans la famille des transporteurs ZIP, à laquelle IRT1 appartient, d'autres gènes pourraient remplir cette fonction (Kim and Guerinot, 2007). Il est important de mentionner que chez le ricin, *Ricinus communis*, une protéine de transport du fer de 11 kDa a été identifiée dans le phloème *in vivo* par marquage du Fe^{3+} (Kruger et al., 2002). Ce transporteur a été nommé ITP (Iron Transport Protein) et il appartient à la famille des déhydrines d'embryogenèse tardive LEA (Late Embryogenesis Abundant); il existe un gène similaire chez *Arabidopsis* n'ayant pas été caractérisé (Kruger et al., 2002).

En s'intéressant au transport du Cd dans le riz, le mutant nommé *phenolics efflux zero 1* (*pez1*) a été isolé à partir d'une banque de mutants d'insertion ADN-T pour son accumulation accrue de Cd (Ishimaru et al., 2011). L'étude de données LC/MS de la sève du xylème du mutant *pez1* a mis en

évidence une quantité élevée d'acide caféique et d'acide protocatéchuique (PCA), deux composés phénoliques. D'autre part, il est apparu que *pez1* accumule plus de fer dans les racines et moins dans le xylème que le génotype de riz sauvage. L'étude de la localisation de la protéine a montré que PEZ1 est située au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires, et des expériences en oocytes de *X. laevis* ont confirmé son rôle dans le transport de PCA. Les auteurs suggèrent que PEZ1 serait un transporteur d'efflux du xylème en charge du transport de PCA vers l'apoplasme. La présence de PCA apoplastique favoriserait la solubilisation des précipités Fe^{3+} , et participerait au transport longue distance du fer chez le riz (Ishimaru et al., 2011).

L'étude du mutant *fpn1* du gène d'*A. thaliana*, l'homologue du gène codant la ferroportine humaine, a permis d'ajouter le gène *AtFPN1/AtIREG1* sur la liste des candidats aux fonctions de transport longue distance du fer depuis les racines vers les feuilles (Morrissey et al., 2009). La ferroportine est une protéine permettant l'export du fer des cellules humaines vers l'extérieur et est présente dans les entérocytes, les macrophages et les hépatocytes.

Chez *A. thaliana*, il existe quatre gènes *NAS*. Deux lignées comportant des mutations dans les quatre gènes *NAS* ont été générées: *nas4x-1* et *nas4x-2* (Klatte et al., 2009). Le mutant *nas4x-1* a un phénotype de carence en fer moins drastique et peut atteindre le stade reproductif et produire des graines. Le niveau de NA contenu dans *nas4x-1* est équivalent à 10% du contenu en NA du génotype sauvage pendant le stade végétatif et, bien que les graines contiennent un niveau de NA équivalent à 40% du niveau des graines de Col-0, la NA est indétectable durant le stade reproductif (Klatte et al., 2009). D'après l'analyse des niveaux d'expression des gènes *YSL1*, *YSL2* et *YSL3* dans le mutant *nas4x-1*, en carence en fer ou en condition contrôle, il apparaît que les racines du mutant subissent une carence en fer et, bien que les feuilles présentent une chlorose internervaire, celles-ci ne manquent pas de fer. Les auteurs proposent qu'une perturbation de la localisation cellulaire ou subcellulaire soit à l'origine de ces phénotypes racinaire et foliaire discordants chez le quadruple mutant *nas4x-1* (Klatte et al., 2009).

Le mutant *nas4x-2* dans lequel les quatre gènes sont inactivés est stérile et présente un phénotype similaire à celui du mutant *chloronerva* (Klatte et al., 2009). Effectivement, les jeunes feuilles présentent de très sévères chloroses internervaires puis, au fur et à mesure de la croissance de la rosette, cette chlorose tend à s'affaiblir et les feuilles ont un aspect plus proche de celles de la plante sauvage (Schuler et al., 2012). Par quantification de chlorophylle et de fer, l'intensité de la chlorose a pu être corrélée au contenu en fer des tissus : les jeunes feuilles sont déficientes en fer alors que les feuilles âgées ont un contenu en fer proche des feuilles de Col-0. La production du quintuple mutant *frd3 nas4x-2* ainsi que des dosages de citrate chez les lignées mutantes et sauvage ont permis de

mettre en évidence l'existence d'une complémentarité partielle du transport du fer par le citrate ou le NA lorsqu'un de ces deux chélateurs est absent. Cette étude montre l'importance de la NA pour l'alimentation en fer *via* le phloème des jeunes tissus foliaires et du citrate pour l'alimentation en fer *via* le xylème des tissus foliaires plus âgés (Schuler et al., 2012). La stérilité de ce mutant est la conséquence de défauts qualitatifs et quantitatifs de production du pollen, de l'incapacité de croissance des tubes polliniques et de la morphologie carpellaire qui entrave la germination du tube pollinique dans le pistil (Schuler et al., 2012). Ces observations attribuent donc un rôle important de la NA dans le développement des organes reproducteurs d'*A. thaliana* et, par conséquent, du transport du fer dans le phloème.

Bien que les quatre gènes *NAS* possèdent des fonctions redondantes, la caractérisation fonctionnelle récente du gène *NAS4* a permis de lui attribuer un rôle plus spécifique dans la réponse à la carence en fer (Koen et al., 2013). Le mutant *nas4* contient moins de NA que le génotype sauvage Col-0 et présente une altération dans son adaptation à la carence en fer. En effet lorsque le milieu de culture est dépourvu de fer, une chlorose internervaire est précocement observée sur les feuilles du mutant et l'induction du système racinaire d'acquisition du fer n'est pas aussi élevée que celle observée chez Col-0. D'après les auteurs, chez le mutant *nas4*, la réduction d'expression de *FRO2* et *IRT1* serait due à la faible quantité de NA pour prendre en charge le fer et assurer sa circulation dans la plante. Ainsi, afin d'éviter les dommages liés à la production de FAO, les auteurs proposent que l'acquisition du fer *via* *IRT1* serait réalisée en fonction de concentration de NA dans les cellules (Koen et al., 2013).

2.3.2. Le stockage du fer intracellulaire

A l'échelle cellulaire, le fer est réparti dans trois compartiments où il est utilisé pour les besoins métaboliques : la mitochondrie, le chloroplaste, la vacuole (Figure I.11).

A l'intérieur de la cellule, 80% à 90% du fer est localisé dans le chloroplaste ce qui en fait un organe central lors d'une fluctuation du contenu en fer cellulaire (Marschner and Marschner, 2012). L'import de fer depuis le cytoplasme est supposé être en partie réalisé par l'intermédiaire de PIC1 (Permease In Chloroplast), une protéine située sur la membrane interne du chloroplaste (Figure I.11) (Duy et al., 2007). Les phénotypes de chlorose drastique et de nanisme en condition limitante de fer ont révélé un rôle majeur de PIC1 dans la répartition optimale du fer dans les différents compartiments cellulaires.

Récemment, il a été mis en évidence que les protéines YSL4 et YSL6 sont des acteurs majeurs de la gestion des stocks de fer chloroplastiques chez *A. thaliana* (Divol et al., 2013). Afin d'identifier les

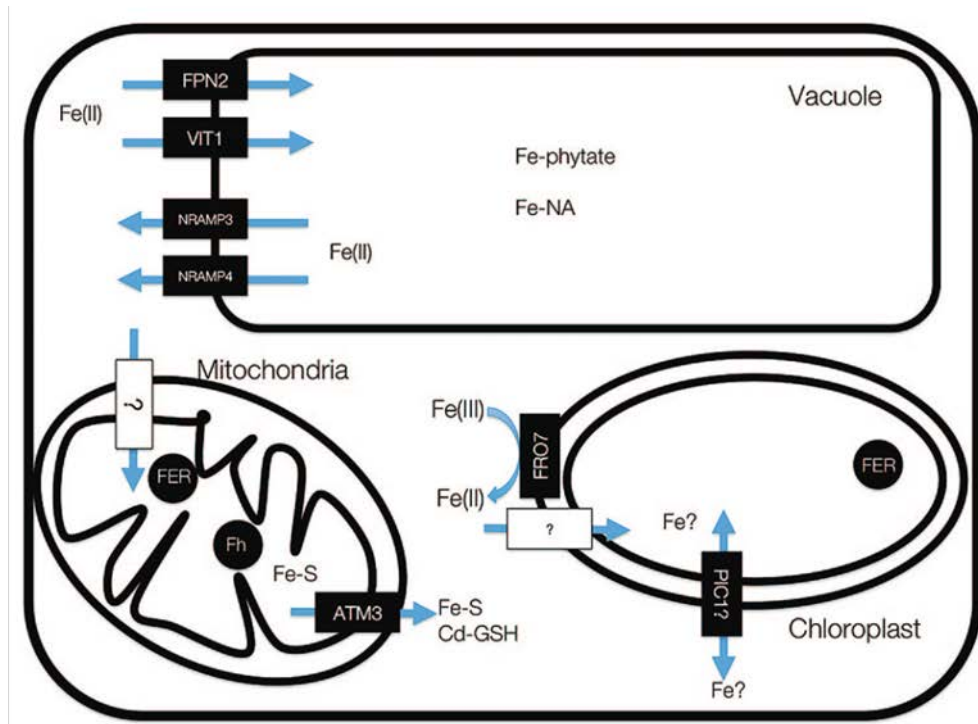


Figure I.11: Schéma du transport et du stockage du fer dans la cellule végétale.

Selon les tissus considérés, le fer présent dans le cytoplasme est transporté dans la vacuole par les transporteurs ferroportine 2 (FPN2) et VIT1 (Vacuolar Iron Transporter). Une fois dans la vacuole, le fer est complexé à des phytates et à la nicotiamine (NA). Les transporteurs NRAMP3 et NRAMP4 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) permettent l'efflux de fer de la vacuole vers le cytoplasme. Dans la mitochondrie, le fer est séquestré par les protéines ferritine (FER) et frataxine (Fh), permettant notamment d'éviter un stress oxydatif. La frataxine est également impliquée dans l'assemblage des centres [Fe-S], qui pourraient être transportés vers le cytoplasme par le transpoteur ATM3 (Arabidopsis Thoredoxine M-type 3). Préalablement à son entrée dans le chloroplaste, le Fe(III) est réduit en Fe(II) par la réductase ferrique FRO7, puis pourrait être pris en charge par PIC1 (Permease In Chloroplast) pour entrer dans l'organite. Dans le chloroplaste, le fer est séquestré par des ferritines (FER).

Morrissey et Guerinot, 2009

fonctions des gènes *YSL4* et *YSL6*, qui sont induits lors d'un excès de fer dans la plante, les simples mutants d'insertion *ysl4* et *ysl6*, ainsi que le double mutant *ysl4ysl6*, ont été étudiés. Alors que les simples mutants ne présentent pas de phénotype, *ysl4ysl6* est plus affecté par un excès de fer que le génotype sauvage Col-0. Une quantification du fer chloroplastique et une analyse par imagerie de la localisation du fer cellulaire ont montré que le double mutant *ysl4ysl6* présente une surcharge en fer chloroplastique en comparaison à Col-0. Parallèlement, les phénotypes aggravés des lignées de surexpression des gènes *YSL4* et *YSL6* en condition de carence en fer ont confirmé le rôle de ces gènes dans la régulation de l'homéostasie du fer. Cette étude suggère l'implication de *YSL4* et *YSL6* dans l'homéostasie du fer chloroplastique, et ce en permettant le relargage du fer vers le cytoplasme pour éviter une trop forte accumulation de fer dans les chloroplastes (Divol et al., 2013).

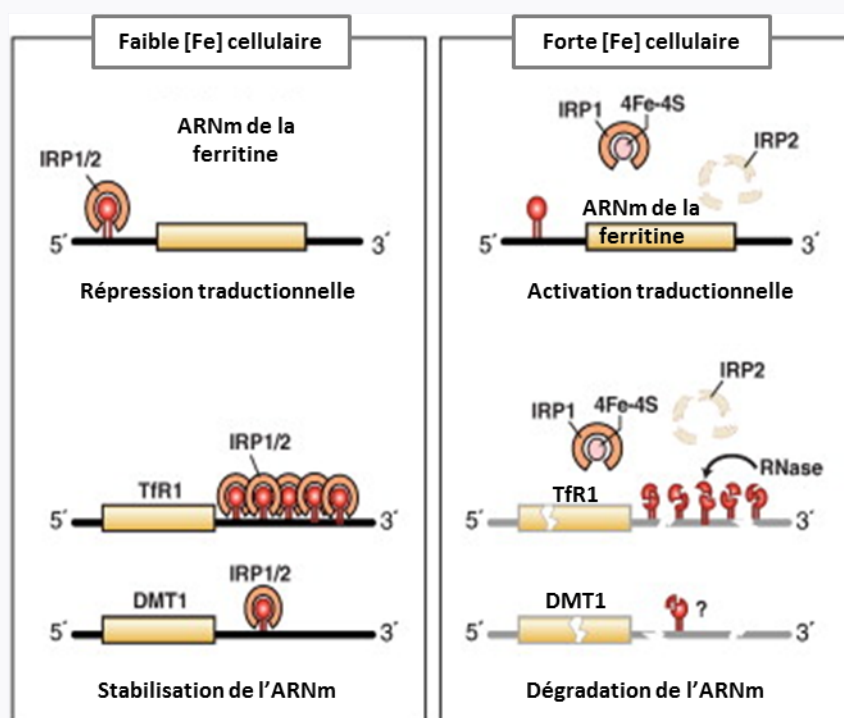
Quand le fer est peu accessible pour la plante, le mutant nul *fro7*, altéré dans l'expression du gène *FRO7*, présente lui aussi un phénotype chlorotique couplé à une diminution de la photosynthèse et une moindre quantité de fer chloroplastique (Figure I.11) (Jeong et al., 2008). La localisation chloroplastique de *FRO7* et sa fonction de réductase ferrique en font potentiellement un partenaire moléculaire impliqué dans le trafic intracellulaire du fer.

Le chloroplaste est également un lieu de stockage du fer où se trouve la ferritine *FER1*, une protéine multimérique capable de contenir jusqu'à 4500 atomes Fe (Figure I.11) (Briat et al., 2010). Chez *A. thaliana* le gène *AtFER1* est régulé au niveau transcriptionnel par le fer *via* une boîte Iron-Dependent Regulatory Sequence (IDRS) située sur son promoteur (Petit et al., 2001). En condition de carence ferrique, la transcription du gène *AtFER1* est réprimée par la liaison d'un répresseur à la boîte IDRS. Cette boîte se retrouve dans les promoteurs des autres gènes *AtFER*, mais sa fonctionnalité n'a pas été testée (Briat et al., 2010).

Chez *A. thaliana* il existe trois autres protéines *AtFER* codées par les gènes *AtFER2*, *AtFER3* et *AtFER4*. *AtFER3*, comme *AtFER1*, est présente dans les plastides des feuilles et des fleurs, *AtFER2* est uniquement présente dans les plastides des graines et *AtFER4* est mitochondriale (Figure I.11) (Briat et al., 2010; Tarantino et al., 2010). L'étude du triple mutant *fer1-3-4* a montré que les ferritines *FER1*, *FER3* et *FER4*, grâce à leur propriété de séquestration du fer, limitent la production de FAO dépendante de la réaction de Fenton (Ravet et al., 2009). Ces auteurs ont également mis en évidence que les protéines *FER1*, *FER3* et *FER4* ne sont pas essentielles au fonctionnement du chloroplaste ni au développement de la feuille. Au cours du stade reproductif, l'absence des protéines *FER1*, 3 et 4 provoque une altération du développement des organes floraux et des fruits chez le mutant *fer1-3-4* (Ravet et al., 2009). Les auteurs attribuent ces troubles développementaux à

Encart I.1: La perception du fer chez les animaux

Chez les mammifères, la protéine Iron Regulatory Protein 2 (IRP2) régule au niveau post-transcriptionnel des gènes du métabolisme du fer (Hentze et al., 2010). La protéine IRP2 est accumulée lors d'une carence en fer et est dégradée quand le fer est présente en condition suffisante. La stabilité d'IRP2 est régulée par la protéine FBXL5 (F-Box and LRR protein 5) qui est le senseur du fer chez les mammifères (Salahudeen et al., 2009). La protéine FBXL5, qui est associée à un complexe ubiquitine ligase E3, possède dans sa partie N-terminale un domaine hémérythine (Hr) qui contient un centre à deux atomes de fer (Thompson et al., 2012). La perception de la quantité de fer serait réalisée au niveau de ce domaine Hr. Ainsi, lorsque le niveau de fer est insuffisant pour les besoins cellulaires, FBXL5 est dégradée permettant l'accumulation d'IRP2, alors qu'en condition suffisante de fer la protéine FBXL5 est stable ce qui provoque la dégradation de IRP2 par le protéasome (Thompson et al., 2012). La protéine IRP1 possède une double fonction d'aconitase et de liaison à l'ARN (Anderson et al., 2012). Lorsque le fer est en quantité suffisante, IRP contient un centre [4Fe-4S] et possède une activité aconitase. En revanche, lorsque la cellule est en maque de fer, la protéine IRP1 perd son centre [4Fe-4S], ne peut plus assurer l'activité aconitase et se fixe aux séquences IRE de transcrits cibles. La régulation d'IRP1 est majoritairement dépendante de la présence du centre [4Fe-4S], bien qu'elle puisse être dégradée comme IRP2 *via* FBXL5. Dans la littérature, il est proposé que l'activité d'IRP1 soit régulée par le "Fe-S switch"; en condition de carence en fer, le centre [4Fe-4S] d'IRP1 est désassemblé et la protéine peut se fixer sur les séquences IRE de ces cibles (Haile et al., 1992).



Le modèle de régulation post-transcriptionnelle par les protéines IRP1 et IRP2 chez les mammifères.

Abréviations: IRP1 et 2: Iron Regulatory Protein1 et 2, TfR1: récepteur de la transferrine, DMT1: Divalent Metal Transporter 1 ou NRAMP2.

Modifié d'après Anderson *et al.*, 2012.

un effet cytotoxique du fer libre, normalement contenu dans les ferritines, *via* un effet pro-oxydant résultant de la réaction de Fenton.

Contrairement aux études menées chez le pois, l'étude du mutant *fer2* d'*A. thaliana* a révélé que la protéine FER2 n'est pas indispensable pour la germination de la graine et le développement de la plantule (Briat and Lobreaux, 1997; Ravet et al., 2009). Toutefois, la sensibilité accrue des graines du mutant *fer2* au stress oxydatif indique que la protéine FER2 serait nécessaire pour prévenir des effets délétères des FAO dans la graine d'*A. thaliana* (Ravet et al., 2009).

La vacuole est également un compartiment de stockage du fer où il se trouve en grande partie lié à la NA ou à des phytates, en particulier dans les graines (Figure I.11) (Morrissey and Guerinot, 2009). L'entrée du fer dans la vacuole est assurée par le transporteur tonoplasmique VIT1 (Vacuolar Iron Transporter 1) (Kim et al., 2006). Le mutant *vit1* présente des défauts de germination en milieu alcalin en plus d'une localisation anormale du fer dans la graine. L'export sous forme Fe^{2+} est réalisé grâce aux transporteurs de cations métalliques divalents NRAMP3 et NRAMP4 (Natural Resistance Associated Macrophage Proteins) (Lanquar et al., 2005). Il a d'ailleurs été montré que les protéines NRAMP3 et NRAMP4 sont accumulées en condition de carence ferrique (Thomine et al., 2003). D'autre part, Morrissey et ses collaborateurs suggèrent qu'AtFPN2/AtIREG2, un autre transporteur d'influx vacuolaire induit en carence en fer, pourrait contribuer avec VIT1 à l'import du fer vacuolaire (Morrissey et al., 2009).

Concernant le transport du fer vers ou depuis la mitochondrie, seul le transporteur du riz MIT1 (Mitochondrial Iron Transporter) a été caractérisé. Un criblage de mutants d'insertion d'ADN-T sur milieu carencé en fer a permis d'identifier le gène *MIT1* (Bashir et al., 2011). La mutation de perte de fonction du gène à l'état homozygote entraîne la létalité mais la version hétérozygote présente une croissance affectée et une diminution de la quantité de fer dans la mitochondrie corrélée à une accumulation de fer dans les tissus aériens. Malgré la présence des centres Fe-S dans des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, très peu de données sont actuellement disponibles quant au rôle de la mitochondrie dans le stockage du fer (Briat et al., 2007).

2.4. La régulation du métabolisme du fer

2.4.1. La perception du fer chez les plantes

Ces mécanismes d'acquisition se mettent en œuvre lorsque la plante est en manque de fer, ce qui suggère que les plantes possèdent un ou plusieurs facteurs moléculaires capables d'évaluer la quantité de fer aux niveaux cellulaire, tissulaire et systémique.

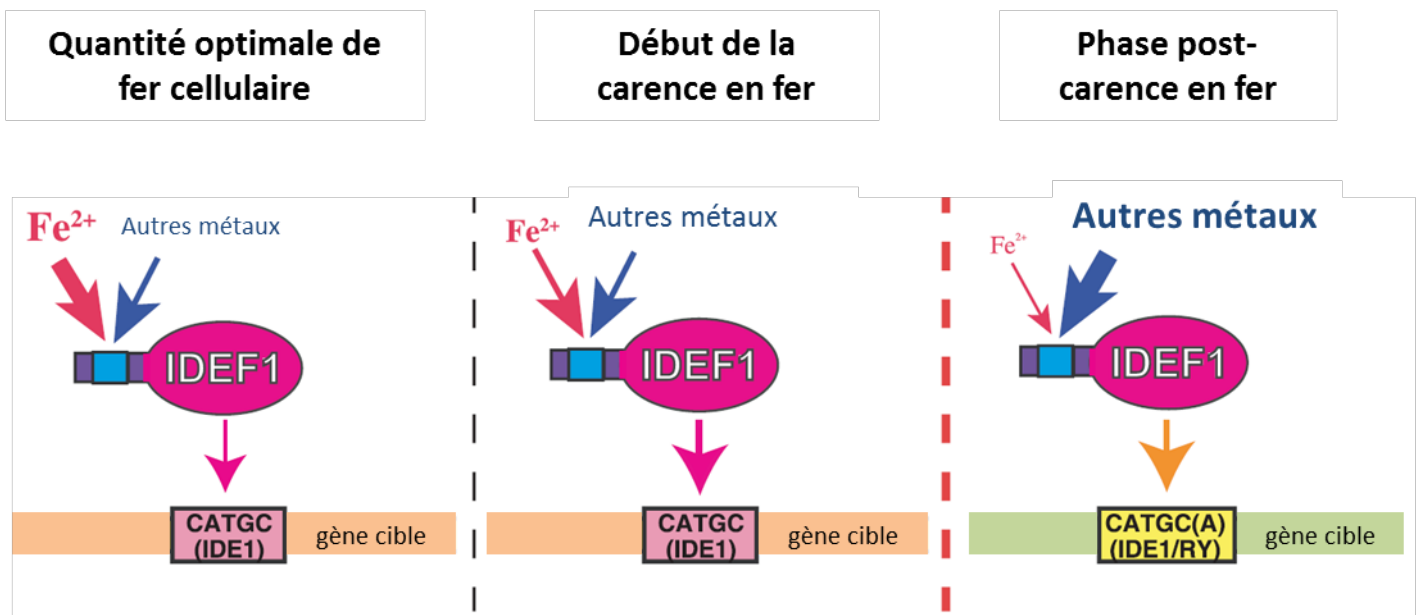


Figure I.12: Le modèle hypothétique de perception et de régulation des gènes du métabolisme du fer par IDEF1 chez le riz.

Dans ce modèle hypothétique le facteur de transcription Iron Deficiency-responsives Element Binding Factor 1 (IDEF1) perçoit le fer et les autres métaux *via* des régions répétées d'histidine-asparagine (HN, en bleu) et de prolines (P, en violet). Le ratio des concentrations de fer et des autres métaux, qui est corrélé aux variations de la quantité de fer cellulaire, gouvernerait les trois phases de régulation de l'expression des gènes de l'homéostasie du fer par IDEF1. Lorsque la concentration en fer cellulaire est optimale et en début de carence en fer, IDEF1 active la transcription de gènes impliqués dans l'utilisation du fer, et ce par la fixation de IDEF1 sur les séquences IDE1 de ces gènes. Dès lors que l'épisode de carence est géré par la cellule végétale, les gènes cibles régulés par IDEF1 ne sont plus les mêmes et le facteur de transcription se fixe alors sur des séquences IDE1 et des éléments RY, afin d'activer l'expression de gènes de réponse à la carence en fer.

Kobayashi *et al.*, 2012.

Chez le riz, OsIDEF1 a été proposé comme senseur du fer. Le facteur de transcription IDEF1, Iron Deficiency-responsive Element (IDE) binding Factor 1, tient son nom des séquences spécifiques IDE des promoteurs des gènes cibles (Figure I.12) (Kobayashi et al., 2007). IDEF reconnaît les cinq acides nucléiques CATGC des séquences IDE *via* les répétitions histidine-asparagine et des régions enrichies en proline située dans la partie N-terminale de la protéine. Lorsque le fer est présent en quantité suffisante dans la cellule ou précocement dans l'établissement de la carence en fer, OsIDEF1 active l'expression d'un groupe de gènes d'utilisation du fer (Kobayashi et al., 2009; Kobayashi et al., 2010). Lorsque la carence en fer s'intensifie, il y a une modification du ratio de la concentration en fer et la concentration des autres métaux dans la cellule. Cette modification entraîne un changement des cibles d'IDEF1 qui active alors l'expression d'un groupe de gènes de réponse à la carence en fer, notamment des gènes responsables de l'acquisition du fer. Pour que la régulation des gènes de l'homéostasie du fer par IDEF1 soit rapide et efficace, il faut que cette protéine soit présente à tout instant dans la cellule. Tout comme cela a été observé pour les transcrits de *FBXL5* (Encart 1), le senseur du fer chez les mammifères, les transcrits du gène *IDEF1* sont régulés indépendamment du statut en fer de la plante (Thompson et al., 2012).

Chez les plantes dicotylédones, aucun système de perception de la concentration de fer n'est identifié l'heure actuelle (Kobayashi and Nishizawa, 2012).

2.4.2. Les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme du fer

Chez *Arabidopsis*, deux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la réponse à la carence ont été identifiés : *FER-like Iron-deficiency-induced Transcription factor (FIT)* et *POPEYE (PYE)* (Bauer et al., 2004; Colangelo, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2008; Long et al., 2010). Ces gènes codent tous deux des facteurs de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix).

Chez la tomate, le mutant *fer* qui présente un phénotype chlorotique sévère, un défaut de croissance et une mort prématurée en carence en fer, a été identifié (Ling et al., 2002). Le gène *FER* a été identifié chez la tomate par clonage positionnel (Ling et al., 2002). Ce gène code un facteur de transcription de type bHLH exprimé en carence en fer dans les racines, plus précisément dans les noyaux où la protéine FER active l'expression de gènes de réponse à la carence en fer comme *IRT1* (Ling et al., 2002). Chez *A. thaliana*, le gène *bHLH29* est l'homologue du gène *FER* (Bauer et al., 2004; Colangelo, 2004; Jakoby et al., 2004; You Xi et al., 2005). L'expression du gène *bHLH29*, aussi nommé *FRU* ou *FIT* par convention, est induite lors d'une carence en fer : les transcrits du gène et la protéine s'accumulent dans l'épiderme racinaire, où la protéine a une localisation nucléaire (Bauer et al., 2004; Colangelo, 2004; Jakoby et al., 2004). Les gènes *FRO2* et *IRT1*, responsables de l'acquisition du

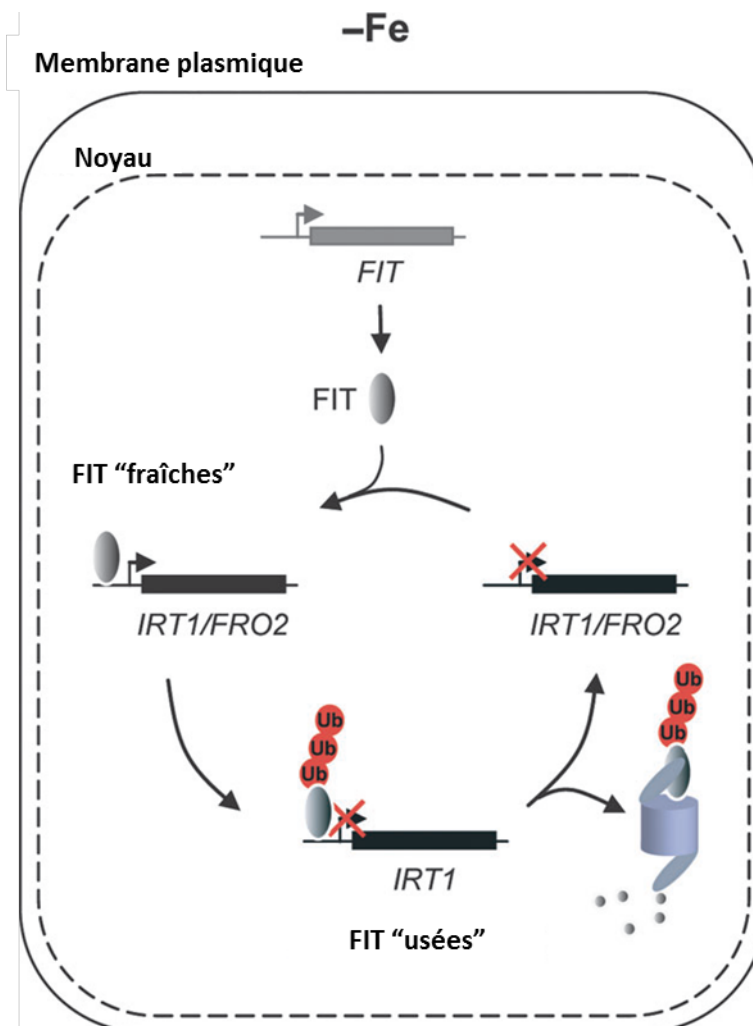


Figure I.13: Le modèle de la régulation de FIT par la carence en fer.

Lorsque la carence en fer est perçue par la plante, les ARNm *FIT* et les protéines FIT sont accumulés dans les cellules racinaires pour initier les réponses de la plante à la carence. Ces réponses incluent l'activation transcriptionnelle des gènes *FRO2* et *IRT1*, impliqués dans l'acquisition du fer.

Parallèlement, la stabilité des protéines FIT diminue et ces protéines sont dégradées par le protéasome 26S, et ce en conséquence de la polyubiquitination de FIT. Cette élimination des protéines FIT « usées » permet l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de FIT par des protéines FIT « fraîches ». Ce roulement permettrait la réinitiation régulière de cycles de transcription des gènes de réponses à la carence en fer, et une adaptation de l'amplitude de cette réponse au taux de dégradation de FIT.

Sivitz et al., 2011

fer, sont contrôlés par FIT au niveau transcriptionnel (Colangelo, 2004). A travers la littérature, il est suggéré que le facteur de transcription FIT active l'expression de *FRO2* et *IRT1*, bien que la liaison de FIT aux promoteurs de ces gènes n'ai jamais été montrée. Concernant la régulation transcriptionnelle de *FIT*, le signal moléculaire activateur n'a pas été identifié. L'analyse d'une lignée de surexpression du gène *FIT* a révélé la coexistence d'un niveau de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Sivitz et al., 2011). En effet, bien que le gène *FIT* soit exprimé constitutivement dans la lignée de surexpression, le niveau d'accumulation de protéine *IRT1* lors d'une carence en fer de trois jours est comparable à celui observé chez la plante sauvage. A l'aide de la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, et de l'inhibiteur du protéasome 26S MG132, les auteurs ont mis en évidence des modifications post-transcriptionnelles et un adressage au protéasome de la protéine *FIT* (Sivitz et al., 2011). En condition limitante de fer, la protéine *FIT* est déstabilisée et dégradée par le protéasome d'une part, et d'autre part la synthèse de la protéine est accrue. Les auteurs interprètent la régulation post-traductionnelle de *FIT* par un besoin de la plante d'avoir des protéines *FIT* « fraîches » (Figure I.13). C'est à dire des protéines rapidement produites puis détruites une fois la fonction d'activation transcriptionnelle assurée (Sivitz et al., 2011). Chez le mutant nul *fit*, on constate que les plantules sont viables à condition d'apporter du fer dans la solution d'arrosage (Colangelo, 2004). En revanche, la sur-expression de *FIT* ne modifie pas l'expression de *FRO2* et *IRT1*, suggérant que *FIT* a besoin d'au moins un partenaire moléculaire pour remplir sa fonction. Grâce un crible double hybride chez la levure puis une confirmation dans des protoplastes d'*A. thaliana*, il a été montré que *FIT* interagit avec les facteurs de transcription *bHLH38* et *bHLH39* (Yuan et al., 2008). Les interactions protéiques *FIT*-*bHLH38* et *FIT*-*bHLH39* permettent l'activation transcriptionnelle de *FRO2* et *IRT1* et une augmentation de la quantité de fer dans la plante (Yuan et al., 2008). En effet, l'expression constitutive de *FIT* et de *bHLH38* ou *bHLH39* conduit à l'expression constitutive de *FRO2* et de *IRT1* et à une plus forte accumulation de fer que les lignées de sur-expression de chacun des trois gènes *FIT*, *bHLH38* et *bHLH39* (Yuan et al., 2008).

Comme énoncé précédemment, un deuxième régulateur a été décrit. Suite à l'étude du transcriptome des différents types cellulaires de la racine d'*A. thaliana*, le facteur de transcription *PYE* a été identifié car l'expression du gène *PYE* est induite par la carence en fer dans le cylindre central racinaire (Dinneny et al., 2008). Le gène *PYE* code un facteur de transcription de type *bHLH* dont l'absence chez le mutant nul *pye-1* provoque une chlorose internervaire, une inhibition de croissance et un défaut de formation des poils absorbants (Long et al., 2010). Chez le mutant *pye1*, l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie des ions métalliques est induite. Parmi ces gènes on retrouve *NAS4*, le gène *FRO3* codant une réductase ferrique, le gène *ZIF1* codant un transporteur de zinc, ou encore *BTS* codant une ubiquitine-ligase E3 de liaison à l'ADN. Ces résultats suggèrent que

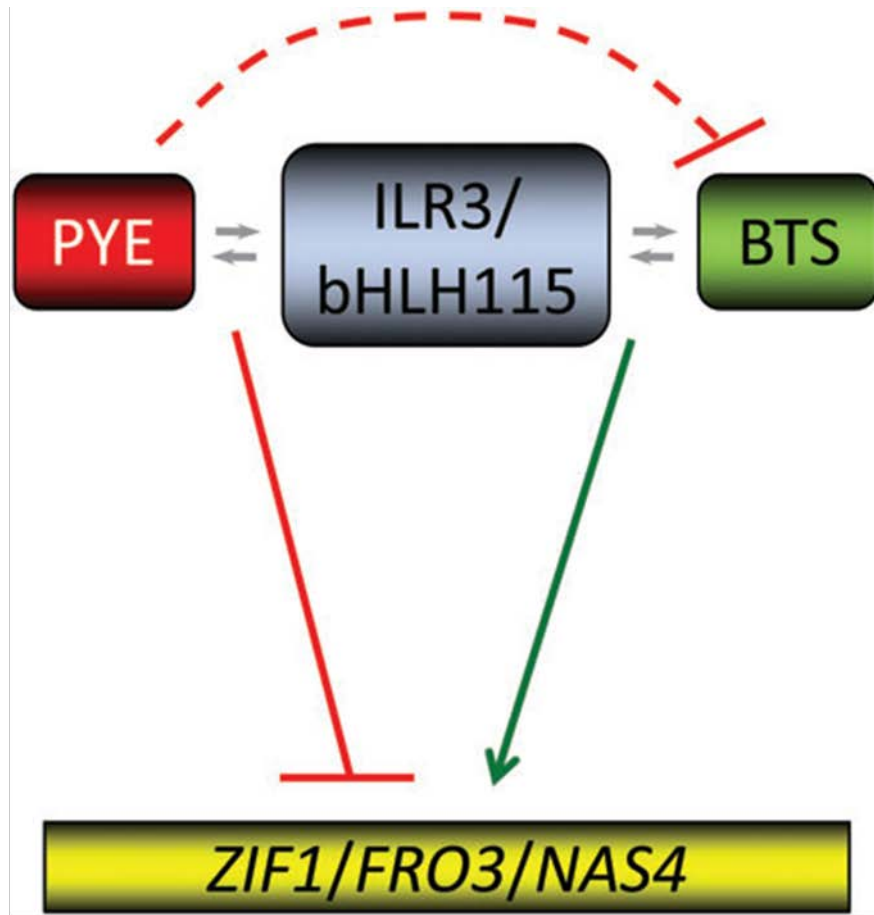


Figure I.14: Le modèle hypothétique de la régulation de la réponse de la plante lors de la carence en fer par PYE.

Les facteurs de transcription POPEYE (PYE) et BRUTUS (BTS) régulent de façon opposée les gènes *Zinc Induced Facilitator 1* (ZIF1), *Ferric Reduction Oxydase 3* (FRO3) et *Nicotianamine Synthase 4* (NAS4). Lors de la carence en fer, ILR3 et bHLH115 pourraient interagir avec PYE pour inhiber l'expression des gènes ZIF1, FRO3 et NAS4. Lorsque le fer est en quantité suffisante dans la cellule, les protéines ILR3 et bHLH115, deux facteurs de transcription de type bHLH, pourraient interagir avec BTS pour activer l'expression des gènes ZIF1, FRO3 et NAS4. D'autre part, PYE réprime indirectement l'expression de BTS.

Ce modèle hypothétique se base sur les interactions protéiques mises en évidence chez *S. cerevisiae* et *A. thaliana*, et des études d'expression de gènes chez les mutants *pye* et *bts*.

Ivanov *et al.*, 2012

PYE exerce une régulation négative de l'expression de ces trois gènes en contexte sauvage (Figure I.14). Une expérience d'immuno-précipitation de la chromatine sur puce à ADN a confirmé que *NAS4*, *FRO3* et *ZIF1* sont des cibles directes du facteur de transcription PYE (Long et al., 2010).

D'autre part, les protéines ILR3 et bHLH115, deux facteurs de transcription de type bHLH, ont été identifiées comme des partenaires d'interaction de PYE à l'issue d'un crible grâce à un système de double hybride chez la levure. Ce crible a mis en évidence qu'un autre facteur de transcription, nommé BTS, est un interacteur protéique de IRL3 et bHLH115. Il se trouve que, dans le transcriptome qui a permis de révéler l'implication de *PYE* dans la réponse à la carence en fer, l'expression du gène *BTS* est également fortement induite. D'après les phénotypes opposés des mutants *bts-1* et *pye-1*, et la présomption d'interacteurs communs, les auteurs émettent l'hypothèse la présence des protéines BTS et PYE dans les cellules permettent l'équilibre de la régulation de l'expression des gènes de l'homéostasie du fer tels que *ZIF1*, *NAS4* et *FRO3* (Figure I.14) (Long et al., 2010).

2.4.3. La régulation hormonale du métabolisme du fer

Outre la régulation des gènes du métabolisme du fer par ces deux facteurs de transcription, plusieurs études montrent que l'auxine, l'éthylène et l'acide nitrique (NO) régulent favorablement la réponse à la carence en fer (Figure I.15) (Romera et al., 2011). Effectivement, un manque de fer chez la plante conduit à l'accumulation de ces trois molécules signal (Romera et al., 2011).

Lorsqu'un manque de fer est perçu par les plantes utilisant la stratégie I, il a été montré qu'une augmentation symplastique et locale de la quantité de fer survient au niveau des racines secondaires et dépend de l'activité d'IRT1 (Giehl et al., 2012). Cette augmentation locale du fer symplastique génère un transport de l'auxine dans les apex des racines secondaires qui a été mis en évidence à l'aide du gène codant l'enzyme β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur *DR5* inducible par l'auxine exprimé chez *A. thaliana* (Giehl et al., 2012). Chez le mutant de transport de l'auxine *aux1*, la réponse d'élongation racinaire consécutive à la carence en fer est perdue, ce qui confirme le rôle de l'auxine dans l'élongation racinaire en réponse au fer. Ces résultats montrent que la présence de fer symplastique résultant de l'activité du transporteur IRT1 serait un prérequis au développement de racines secondaires, un processus développemental majoritairement sous le contrôle de l'auxine (Giehl et al., 2012).

En condition de carence en fer, l'ajout du précurseur de l'éthylène ACC provoque une induction de *FIT*, laquelle résulte en une activation transcriptionnelle de *FRO2* et *IRT1* (Lucena et al., 2006; Lingam et al., 2011). Récemment, l'interaction entre *FIT* et les facteurs de transcription de réponse à

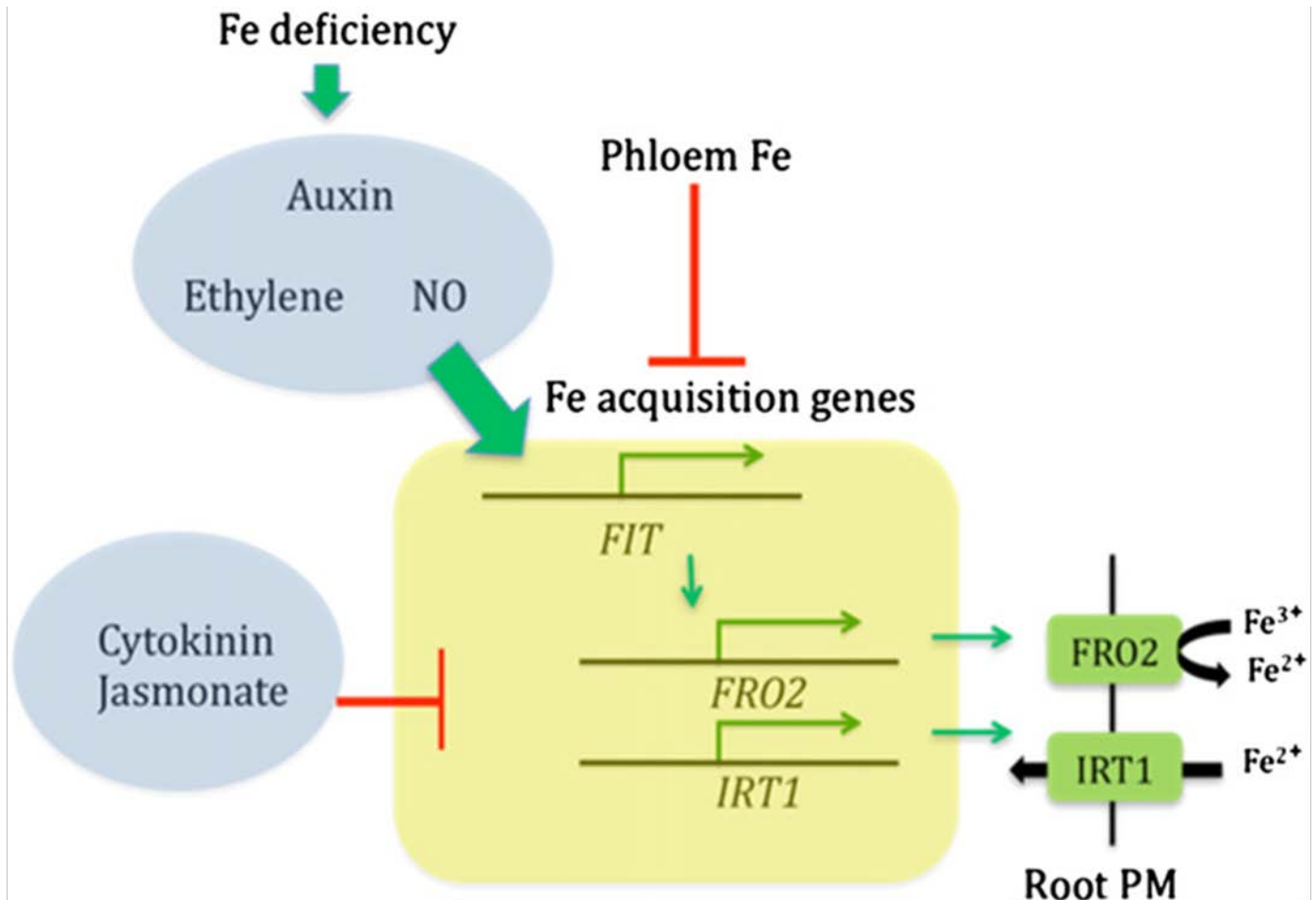


Figure I.15: Le modèle de la régulation hormonale des acteurs moléculaires de la stratégie I d'acquisition du fer.

L'auxine, l'éthylène et l'oxyde nitrique (NO) sont impliqués dans la régulation positive de l'expression des gènes d'acquisition du fer *FIT*, *FRO2* et *IRT1*. Les hormones cytokininine et jasmonate sont impliquées dans la régulation négative de l'expression des gènes d'acquisition du fer *FRO2* et *IRT1*, indépendamment de la régulation par *FIT*. Le fer contenu dans le phloème traduirait la fin de la carence en fer et régulerait négativement l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. PM: membrane plasmique.

Hindt and Guerinot, 2013

l'éthylène EIN3 et EIL1 a été démontrée comme importante et nécessaire à l'accumulation des transcrits *FIT* et à l'expression de ses gènes cibles chez *A. thaliana* (Lingam et al., 2011). Lors de la carence en fer, EIN3/EIL1 interagissent physiquement avec FIT, ce qui limite la dégradation de FIT par le protéasome 26S (Lingam et al., 2011). Le mécanisme par lequel l'interaction entre FIT et EIN3/EIL1 limite la dégradation de FIT n'a pas été identifié. Afin d'identifier des cibles de EIN3/EIL1 en condition limitante de fer, l'analyse transcriptomique du mutant *ein3/eil1* en condition contrôle ou limitante de fer, en comparaison à la lignée sauvage Col-0, a été entreprise (Lingam et al., 2011). Parmi les cibles d'EIN3/EIL1, des gènes impliqués dans le remodelage de l'appareil photosynthétique et des gènes de réponses aux FAO ont été identifiés. Les auteurs proposent que l'éthylène, *via* l'action d'EIN3/EIL1, favoriserait une réorganisation des photosystèmes et la détoxication des FAO pour limiter les effets cytotoxiques liés à l'éclairement lors d'une carence en fer (Lingam et al., 2011).

L'application exogène d'oxyde nitrique chez la tomate (NO) induit l'accumulation des transcrits de *FER*, *LeFRO1* et *LeIRT1* alors qu'en présence d'un piègeur de NO le nombre de transcrits de ces gènes décroît (Graziano and Lamattina, 2007). La nitrate réductase (NR) est une enzyme qui participe à la formation de NO en catalysant la réduction du nitrite. Chez le mutant *nia* de la tomate, dont l'activité NR est estimée à 20% de celle de la plante sauvage, les transcrits de *LeFER*, *LeFRO1* et *LeIRT1* ont un niveau d'accumulation réduit lors d'une carence en fer, en comparaison avec les niveaux accumulés pour le génotype sauvage (Graziano and Lamattina, 2007). Chez *A. thaliana* lors d'une carence en fer, la présence de NO stabilise les protéines FIT en limitant leur dégradation par le protéasome (Meiser et al., 2011).

La hiérarchie d'action de ces trois molécules signal est décrite suivant des modèles proposés par différents auteurs (Figure I.15). Les résultats issus d'une étude croisée d'un mutant nul de transport de l'auxine et de surexpression de l'auxine seraient en faveur d'une action de l'auxine en amont de l'action du NO (Chen et al., 2010). Par ailleurs, en utilisant des tests pharmacologiques pour augmenter ou éteindre la signalisation déclenchée par le NO et/ou l'éthylène, puis en observant les niveaux d'expression de gènes de réponse à la carence en fer, au NO et à l'éthylène, García et al. proposent un modèle dans lequel la production racinaire de NO promeut la production d'éthylène, et réciproquement, générant une boucle d'activation transcriptionnelle des gènes d'acquisition du fer en condition limitante (García et al., 2011).

D'autres signaux régulent négativement la réponse à la carence en fer. Il s'agit des cytokinines (CK) et du jasmonate (JA) (Figure I.15) (Seguela et al., 2008; Maurer et al., 2011). A l'aide d'un apport exogène de méthyl-jasmonate (MeJA), d'ibuprofène qui est un inhibiteur de lipoxigénase et des mutants *jar1-1* et *coi1*, qui sont déficients pour la biosynthèse et la perception de la forme active du

JA (JA-Ileu, voir ci-dessous) respectivement, il a été montré que le JA réprime l'expression de *FRO2* et *IRT1* lors de la carence en fer (Maurer et al., 2011). Cette action du jasmonate pourrait résulter de l'adaptation aux stress biotiques, limitant ainsi la quantité de fer disponible pour les enzymes dépendantes du fer impliquées dans la mort cellulaire lors d'une infection par un agent pathogène (Maurer et al., 2011).

L'application exogène de CK sur des plantes d'*A. thaliana* conduit à la réduction du niveau de transcrits *FRO2*, *IRT1* et *FIT*, ainsi qu'une diminution de la quantité de protéine IRT1 et de l'activité réductase ferrique et ce indépendamment de la concentration en fer du milieu (Seguela et al., 2008). Cette inhibition par les CK de la machinerie d'acquisition du fer est réduite dans les mutants de perception des CK *cre1* et *ahk3*, et presque nulle dans le double mutant *cre1 ahk3*, ce qui montre que la répression de *IRT1* et *FRO2* est sous le contrôle de la signalisation CK (Seguela et al., 2008). Les auteurs ont voulu savoir si la répression de l'expression de *FRO2* et *IRT1* par les CK, qui a lieu indépendamment de la quantité de fer présente dans le milieu de culture, est la conséquence d'une régulation négative de la croissance racinaire exercée par les CK. Pour répondre à cette question, différents traitements inhibant la croissance racinaire ont été réalisés, tels que le stress osmotique en présence de mannitol ou une forte concentration d'auxine. Ces expériences ont permis de montrer que l'effet des cytokinines n'est pas spécifique et que l'expression d'*IRT1* est réprimée en condition de réduction de croissance racinaire indépendamment de la présence de fer (Seguela et al., 2008). Ces résultats reflètent une intégration de plusieurs signaux par la plante dus aux conditions de l'environnement.

3. Présentation générale des interactions plantes – agents pathogènes

Les organismes vivants n'étant pas isolés les uns des autres, ils établissent des interactions. Ainsi, de nombreux microorganismes peuvent se trouver au contact des végétaux et selon les bénéfices retirés par ces deux acteurs, ces interactions sont qualifiées de symbiotique, commensale, saprophyte ou pathogène (Lepoivre, 2003). L'organisme végétal est une source abondante de nutriments que les microorganismes peuvent exploiter. Les microorganismes symbiotiques tirent parti des nutriments issus de la plante tout en étant bénéfiques pour le partenaire végétal, en apportant une source d'azote par exemple. C'est le cas dans les relations symbiotiques qui associent des plantes légumineuses aux bactéries du genre *Rhizobium* (Lepoivre, 2003). Dans le cadre d'une relation commensale, les microorganismes utilisent les ressources végétales sans compromettre le métabolisme de la plante. En vivant sur les organes végétaux morts, les champignons saprophytiques assurent leur nutrition tout en participant à la dégradation de la matière organique (Lepoivre, 2003).

Le besoin de l'homme d'augmenter la production végétale conduit à des pratiques culturales pouvant modifier l'équilibre naturel de ces relations entre plantes et microorganismes, et notamment favoriser le développement de maladies dues aux mécanismes phytopathogènes (Lepoivre, 2003). La densité et la date d'un semis, les pratiques d'irrigation ou encore l'utilisation de fertilisants et de produits phytosanitaires sont des éléments impactant sur la physiologie des végétaux et donc sur la capacité d'un microorganisme à coloniser la plante. Afin de diminuer les risques phytosanitaires et l'impact environnemental des pratiques culturales, il est nécessaire de mieux comprendre les interactions entre les agents pathogènes et leurs hôtes, les mécanismes de pathogénie, et de résistance ou de sensibilité des plantes à ces microorganismes.

3.1. Etape 1 : Atteindre les tissus végétaux

3.1.1. Les stratégies d'infection des microorganismes pathogènes

Les stratégies d'infection peuvent impliquer trois types d'action: 1) l'attaque de la cellule végétale, 2) la protection du microorganisme pathogène et notamment de ses structures d'infection contre les réponses activées par la cellule végétale, 3) le contournement ou l'inhibition des réponses immunitaires de la plante.

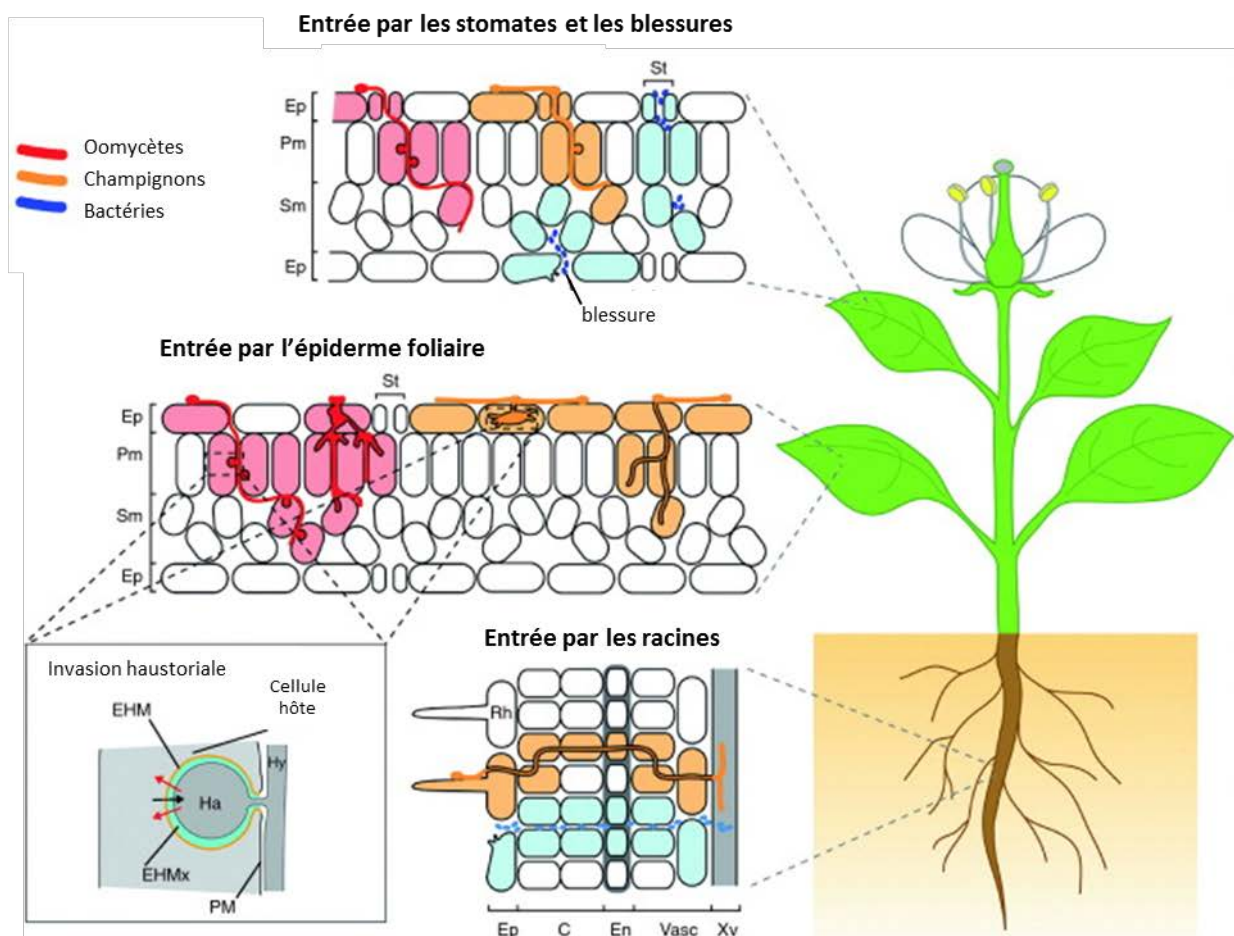


Figure I.16: Les modalités d'entrée des microorganismes pathogènes dans les tissus végétaux.

Les agents pathogènes pénètrent dans les tissus et les cellules par les stomates ou par des blessures, sur les faces abaxiales et adaxiales des feuilles, ou alors ils pénètrent directement dans les épidermes foliaires et racinaires. Chacun de ces mécanismes d'invasion permet au microbe d'être en contact avec différents types cellulaires. Les microorganismes filamenteux demeurent néanmoins à l'extérieur de la cellule hôte, même lorsque la cellule végétale est envahie par un haustorium ou des hyphes. Les haustoria sont enveloppés d'une matrice extrahaustoriale (EHM) et la membrane extrahaustoriale dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte. La EHM forme un continuum avec la membrane plasmique de la cellule végétale, et est proposée comme site privilégié de sécrétion des effecteurs et d'acquisition des nutriments par le microbe.

Abbréviations: épiderme (Ep), parenchyme palissadique (Pm), parenchyme lacuneux (Sm), stomate (St), poils racinaires (Rh), cortex (C), endoderme (En), tissus vasculaires (Vasc), vaisseaux du xylème (Xv), hyphe (Hy), haustorium (Ha), matrice extrahaustoriale (EHMx), membrane extrahaustoriale (EHM).

Adapté d'après Faulkner and Robatzek, 2012

3.1.1.1. Les stratégies d'attaque

3.1.1.1.1. La dégradation de la paroi de la cellule végétale

Pour faciliter la pénétration par l'appressorium, ou l'entrée directement dans la cellule et l'accès au contenu cellulaire, certains microorganismes ont recours à des enzymes de dégradation de la paroi pecto-cellulosique (Figure I.16) (Faulkner and Robatzek, 2012). En effet, la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi est une stratégie d'infection répandue chez les agents pathogènes (Lepoivre, 2003). Ces enzymes de dégradation ont pour substrat les composés de la paroi végétale : la cellulose, l'hémicellulose, les pectines et d'autres polysaccharides pariétaux (Lagaert et al., 2009). Un microorganisme pathogène donné produit et sécrète un cocktail d'enzymes qui lui est propre et qui affecte tout ou parti l'intégrité de la paroi végétale.

C'est le cas des microorganismes pathogènes nécrotrophes et hémi-biotrophes, qui se multiplient dans des cellules mortes, et qui pénètrent directement dans le tissu végétal (Figure I.16). Une fois à l'intérieur, les microorganismes filamenteux, oomycètes et champignons, peuvent former un haustorium dans la cellule ou développer des hyphes invasifs à l'échelle tissulaire, comme *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) ou *Magnaporthe oryzae* respectivement (Kankanala et al., 2007; Hueckelhoven and Panstruga, 2011). Une autre illustration est celle de la bactérie pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* qui sécrète des xylanases et *M. oryzae* qui sécrète des cellulases et des xylanases promouvant l'agressivité (Szczesny et al., 2010; Jung et al., 2012). L'entérobactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* utilise également des enzymes pectinolytiques pour l'infection sur plante hôte (Reverchon and Nasser, 2013). L'implication de ces enzymes dans la pathogénie de *D. dadantii* sera traitée au paragraphe 4.1.2.1.1. de l'introduction.

3.1.1.1.2. La sécrétion de composés phytotoxiques

Certains microorganismes pathogènes produisent des toxines qui sont des métabolites secondaires participant au pouvoir pathogène du microbe en favorisant la mort cellulaire ou la reprogrammation de l'expression du génome de la plante hôte (Faulkner and Robatzek, 2012).

La toxine HC est une toxine spécifique produite par le champignon pathogène *Cochliobolus carbonum* sur plante hôte, le maïs (Walton, 2006). En comparaison avec la souche sauvage de *C. carbonum*, les souches dépourvues de la toxine HC provoquent des lésions réduites sur les plants de maïs sensibles (Ahn and Walton, 1996). Ce tétrapeptide cyclique participe donc à la pathogénie du champignon. La présence de cette toxine dans la cellule végétale inhibe l'action des histones déacétylases, ce qui provoque une hyperacétylation des histones et modifie l'expression des gènes

de la plante hôte. Les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle parmi ces gènes se trouvent des gènes impliqués dans les réponses immunitaires (Brosch et al., 1995).

Un autre exemple de toxine est celui de la tabtoxine sécrétée par l'agent de la maladie du feu sauvage du tabac *P. syringae* pv. *tabaci*. Il s'agit d'une toxine non spécifique nommée β -lactame-tabtoxine (T β L) (Turner and Debbage, 1982). Chez *Nicotiana benthamiana*, la T β L inhibe la glutamine synthétase qui catalyse la production de glutamine à partir du glutamate. Cette inhibition conduit alors à l'accumulation excessive d'ions ammonium dans les cellules et provoque les lésions chlorotiques caractéristiques de cette maladie (Turner and Debbage, 1982).

3.1.1.2. La protection des structures d'infection

Les structures d'infection mises en place par les agents pathogènes vont être perçues par la plante et soumises à des composés d'origine végétale qui vont nuire à leur intégrité. Parmi ces composés, on peut trouver des FAO ou des enzymes de dégradation des parois fongiques.

L'exemple de la superoxyde dismutase Mn-SOD de *D. dadantii* illustre l'importance de la protection contre les effets toxiques des FAO. Sur la plante hôte *S. ionantha*, la souche déficiente dans la Mn-SOD n'est pas capable de provoquer la macération du tissu végétal, contrairement à la souche bactérienne sauvage (Santos et al., 2001). Ce résultat indique que la détoxification du stress oxydant produit par la plante lors de l'infection est nécessaire à la pathogénie de la bactérie.

Plus récemment, la protection de structures d'infection fongiques contre la dégradation par l'hôte végétal a été mise en évidence. Lors de la colonisation de la plante hôte *Solanum lycopersicum*, le pathogène fongique *Cladosporium fulvum* sécrète l'effecteur Avr4. Avr4 est une protéine de type lectine qui se fixe sur la chitine et protège la paroi cellulaire du champignon contre la dégradation par des chitinases d'origine végétale (van den Burg et al., 2006; van Esse et al., 2007). Ecp6, un autre effecteur de *C. fulvum* abondamment sécrété lors de la colonisation de la plante, est une protéine de type lectine à domaine LysM requise pour l'intégrité de la pathogénie du champignon pathogène. Il a été montré qu'en se fixant à la chitine, Ecp6 empêche sa détection par les récepteurs de la cellule végétale et donc le déclenchement de réponses de défense (de Jonge et al., 2010).

3.1.1.3. La suppression des réponses immunitaires de la cellule végétale

Certaines bactéries pathogènes sont dotées d'un système de sécrétion de type III (SST3) qui leur permet l'injection dans le cytoplasme de la cellule hôte d'effecteurs spécifiques dits de type III (Feng

and Zhou, 2012). Chez les plantes, ces effecteurs de type III ont pour cibles des protéines ou l'ADN de la cellule végétale, et ont pour but, entre autre, d'entraver la mise en place des défenses de l'hôte (Feng and Zhou, 2012).

En effet, la présence des microorganismes est détectée par la cellule végétale et déclenche des réponses de défenses empêchant l'infection par la plupart des microorganismes pathogènes (Jones and Dangl, 2006). Ce niveau de défense est appelé PTI, pour Pattern-Triggered Immunity, est activé suite à la perception de molécules microbiennes conservés telles que la flagelline, et sera traité plus en détail au paragraphe 3.2. de l'introduction. Néanmoins, certains agents pathogènes possèdent dans leur arsenal des effecteurs capables de contourner ou supprimer la PTI. Ces effecteurs favorisent donc l'infection. C'est l'ETS, pour Effector-Triggered Susceptibility. Si ces effecteurs sont reconnus par la cellule végétale, l'interaction est qualifiée d'incompatible et la plante met en place un programme de défense nommé ETI (Effector-Triggered Immunity), plus intense et plus rapide que celui établi au cours de la PTI. L'effecteur reconnu par une plante peut aussi être appelé « protéine d'Avirulence » et la souche d'agent pathogène qui l'exprime est alors dite « avirulente ». L'ETI peut elle-même être contournée par les microorganismes au moyen d'autres effecteurs. En revanche, si la cellule végétale n'est pas génétiquement équipée pour reconnaître un effecteur, la plante est dite sensible à l'agent pathogène considéré, qui est dit « virulent » et l'infection est poursuivie. L'interaction est alors qualifiée de compatible.

Pour illustrer la suppression de la PTI par un effecteur microbien, je vais présenter l'exemple de l'effecteur AvrPto de *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Certaines souches de *Pst* expriment le gène *avrPto* qui code l'effecteur de type III AvrPto (Ronald et al., 1992). AvrPto assure la suppression de la PTI en interagissant avec les récepteurs de la flagelline FLS2, du facteur d'élongation de la traduction EF-Tu EFR chez *A. thaliana*, et avec le récepteur de la flagelline LeFLS2 chez la tomate (Xiang et al., 2008). Cette interaction a pour conséquence l'inhibition de l'activité kinase de ces récepteurs et donc empêche le déclenchement de la signalisation de mise en place des défenses dites PTI de la cellule végétale (Xiang et al., 2008).

Un autre exemple est celui de l'effecteur de type III HopZ1, produit par *P. syringae* pv. *glycinea* (*Pgy*) et qui participe à la pathogénie de la bactérie sur le soja (Zhou et al., 2011). HopZ1 appartient à la famille YopJ, des protéases/acétyltransférases à cystéines (Ma et al., 2006). En se basant sur l'hypothèse que HopZ1 utilise son activité protéase/acétyltransférase à cystéines pour manipuler la cellule végétale, Zhou et al. ont réalisé un crible double hybride chez la levure pour identifier les cibles végétale de HopZ1 (Zhou et al., 2011). Les auteurs ont identifié la 2-hydroxyisoflavone déshydratase (GmHID1) comme interacteur de HopZ1, une enzyme de biosynthèse de l'isoflavone,

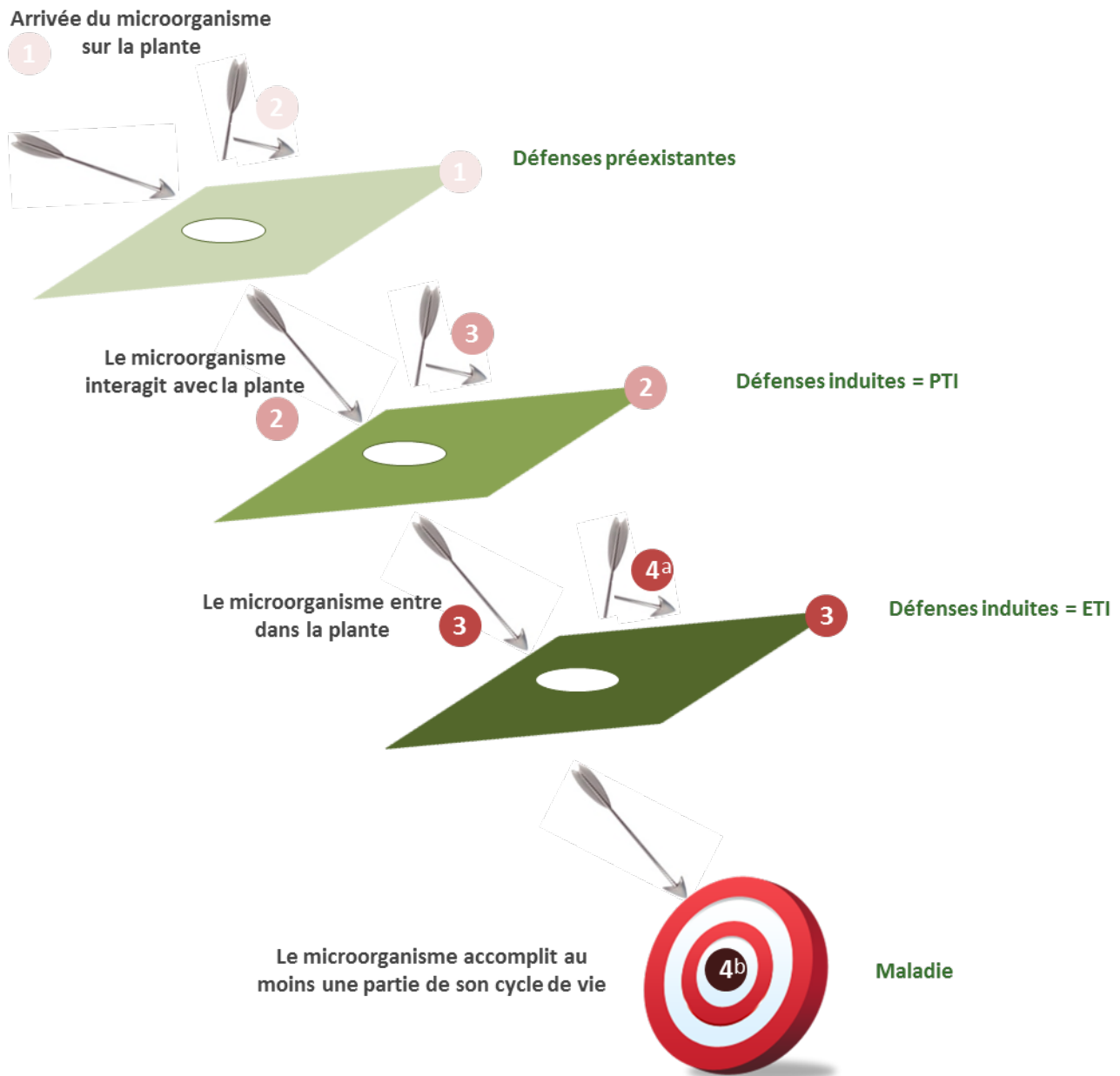


Figure I.17: Les étapes de colonisation d'une plante par un agent pathogène et les réponses immunitaires déployées.

La première étape (1) est la rencontre physique entre l'agent pathogène et le tissu végétal qui comporte des barrières physiques et chimiques à l'entrée de pathogène. Si le pathogène réussit à franchir ces défenses préexistantes (2), celui-ci peut être reconnu par la plante au moyen de récepteurs membranaires et ainsi déclencher une signalisation spécifique conduisant à l'induction de réponses immunitaires (PTI). Si le pathogène contourne et/ou évite la PTI (3), celui-ci peut être doté d'effecteurs spécialisés dans le processus de virulence. Selon le patrimoine génétique de la plante, sa capacité à reconnaître cet effecteur et induire des réponses immunitaires adaptées (ETI), la plante résiste à l'infection (4a) ou développe la maladie (4b).

un métabolite secondaire aux propriétés antimicrobiennes. Des expériences complémentaires de BiFC ont confirmé *in vitro* l'interaction entre l'effecteur bactérien HopZ1 et GmHDI1. HopZ1 est donc un effecteur bactérien qui réprime la PTI en inhibant la voie de biosynthèse de l'isoflavone.

3.1.2. Les défenses préexistantes des végétaux

Avant que l'agent pathogène n'atteigne la cellule végétale, il fait face à plusieurs obstacles physiques et chimiques établis par la plante. Par exemple, les organes aériens et foliaires en particulier sont recouverts de cires et de trichomes qui limitent physiquement l'accès des microorganismes aux cellules de l'épiderme végétal (Lepoivre, 2003). La paroi végétale, par ses composés structuraux tels que la lignine et la cellulose, constitue une protection passive et réduit la possibilité d'atteindre la membrane cellulaire pour les microbes.

L'apoplasme est un compartiment cellulaire particulièrement hostile pour les agents pathogènes. En plus des obstacles physiques, l'agent pathogène y rencontre diverses substances chimiques qui lui sont toxiques. On peut y trouver des composés antimicrobiens à large spectre tels que des peptides, des protéines et des métabolites secondaires appelés phytoanticipine (Hückelhoven, 2007). Ces barrières physiques et chimiques préformées peuvent empêcher l'établissement des structures d'infection mises en place par certains microorganismes pathogènes (Heath, 2000; Dixon, 2001; Kamoun, 2001; Piater, 2004). Par exemple, *Septoria lycopersici*, le champignon pathogène à l'origine de la septoriose de la tomate, a besoin de sécréter la tomatinase pour infecter la tomate avec succès (Martin-Hernandez et al., 2000). La tomatinase est une enzyme de dégradation de l' α -tomatine, une phytoanticipine de type saponine qui est accumulée dans les cellules saines de cette plante (Roddick, 1974).

3.2. Etape 2 : La reconnaissance moléculaire et l'induction des défenses des plantes

Outre les barrières préformées, les plantes peuvent activer les défenses suite à la détection des microorganismes (Figure I.17).

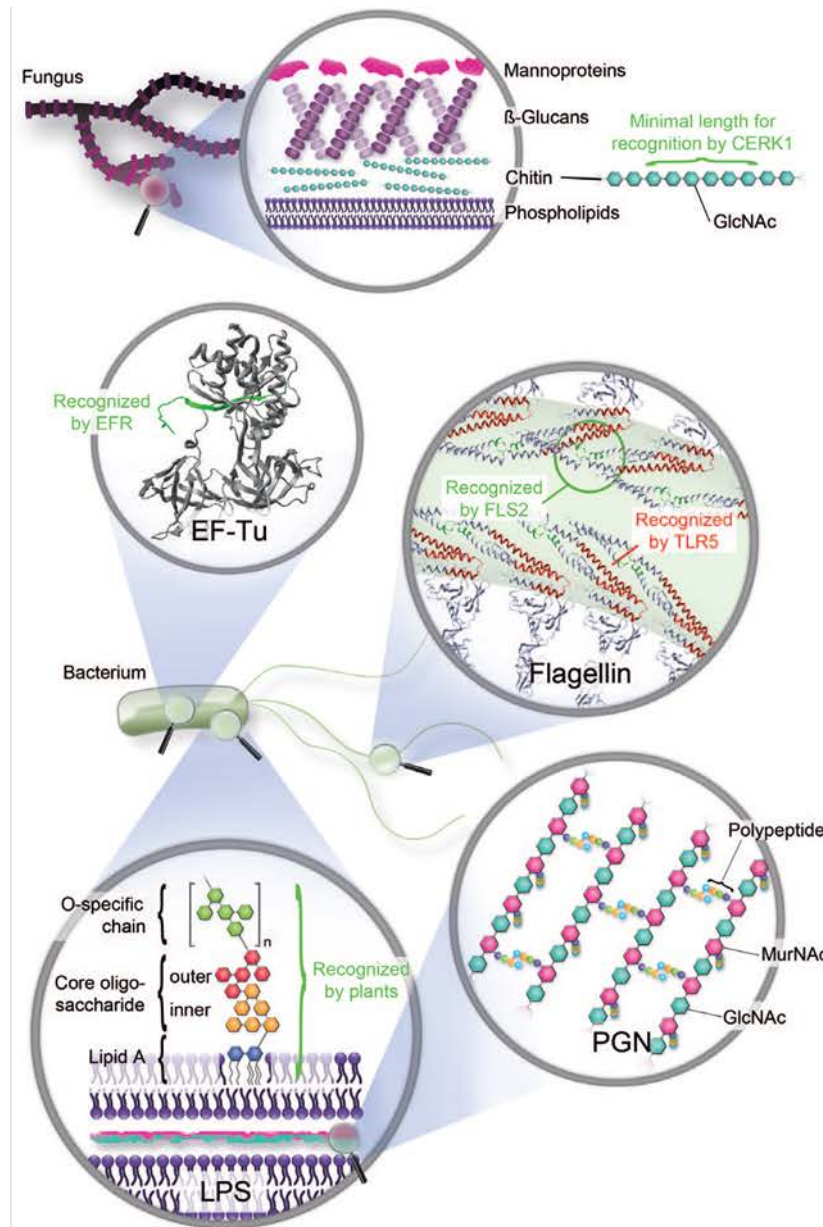


Figure I.18: La représentation schématique de différents motifs moléculaires associés aux microorganismes (MAMP).

La chitine: les polymères GlcNAc (en bleu) de chitine sont des composants importants de la paroi. Un oligomère minimal de six unités GlcNAc est requis pour le dimérisation de CERK1 et le déclenchement des réponses immunitaires de la cellule végétale. Le facteur d'élongation EF-Tu: C'est la partie N-terminale acétylée de EF-Tu, protéine présente dans le cytoplasme bactérien, qui est reconnue par le récepteur EFR de la cellule végétale. Ici est représentée la structure de EF-Tu chez *E. coli*. La flagelline: les flagelles bactériens sont formés de monomères de flagelline. Ces monomères de flagelline ont une partie accessible et une partie non accessible depuis l'extérieur du flagelle. Ces deux parties sont reconnues par le récepteur végétal FLS2 (vert), alors que le récepteur TLR5 des cellules animales ne reconnaît que la partie extérieure au flagelle. Ici est représentée la structure de la flagelline chez *Salmonella typhimurium*. Le lipopolysaccharide LPS: La molécule de LPS est généralement composée de trois parties: une chaîne O-spécifique (vert), une partie core d'oligosaccharide (rouge/jaune) et un domaine lipide A (bleu). Ces trois parties sont capables de déclencher des réponses de défense chez la plante. Le LPS est ancré dans la membrane extérieure des bactéries à Gram négatif.

Modifié d'après Pel and Pieterse, 2013

3.2.1. La reconnaissance de motifs moléculaires associés à la présence de microorganismes (MAMP) ou aux dégâts (DAMP)

3.2.1.1. Les MAMP et les récepteurs associés

Comme les animaux, les plantes sont équipées de récepteurs qui perçoivent et reconnaissent des motifs moléculaires associés aux microorganismes, nommés MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern), pouvant révéler leur présence. Un MAMP est un motif moléculaire toujours associé au microbe et qui est présent et conservé chez un ou plusieurs ensembles taxonomiques de microorganismes (Figure I.18) (Pel and Pieterse, 2012). De ce fait, les MAMP ont un rôle majeur dans le cycle de vie du microorganisme et sont, par exemple, des constituants structuraux tels que le peptidoglycane des parois bactériennes, les lipopolysaccharides de surface (LPS) des membranes des bactéries à Gram négatif, la chitine des parois fongiques, l'heptaglucone des parois de certains oomycètes ou encore le facteur d'élongation de la traduction bactérien EF-Tu (Monaghan and Zipfel, 2012). La protéine Ax21 impliquée dans le quorum-sensing des bactéries du genre *Xanthomonas*, les xylanases fongiques, et certaines molécules issues de la dégradation de composés d'origines végétales comme des peptides ou des oligosaccharides, sont capables de déclencher des réponses immunitaires chez les plantes (Monaghan and Zipfel, 2012).

Les récepteurs des MAMP sont nommés Pattern-Recognition Receptor (PRR). Les PRR permettent la détection précoce des microorganismes pathogènes (Monaghan and Zipfel, 2012). Il existe différents PRR dédiés à la reconnaissance de différents types de MAMP. La reconnaissance d'un MAMP par le récepteur PRR associé initie la mise en place d'un programme de défenses immunitaires chez la plante dit PTI (Monaghan and Zipfel, 2012). Les récepteurs PRR sont de deux types protéiques: les Receptor-Like Kinases (RLK) et les Receptor-Like Protein (RLP), nommés dans ce manuscrit PRR-RLK ou PRR-RLP respectivement (Figure I.19). Les PRR-RLK et PRR-RLP sont localisés au niveau de la membrane plasmique, ils reconnaissent leurs ligands *via* un domaine extracellulaire (ECD) et possèdent un domaine transmembranaire. Les récepteurs de type PRR-RLK possèdent également un domaine kinase intracellulaire; les récepteurs de type PRR-RLP possèdent un domaine intracellulaire très court qui ne présente pas de fonction de signalisation (Monaghan and Zipfel, 2012). Les ECD des PRR sont variables et sont constitués des domaines modulaires suivants: des modules LRR (Leucine-Rich Repeat), des modules LysM permettant la liaison de carbohydrates (CBM: Carbohydrate-Binding Module) ou des modules EGF-Like (Epidermal Growth Factor-Like) (Monaghan and Zipfel, 2012).

Dans un souci de refléter la diversité des modalités de reconnaissance, je vais maintenant présenter quelques exemples de MAMP et PRR associés les plus étudiés à l'heure actuelle.

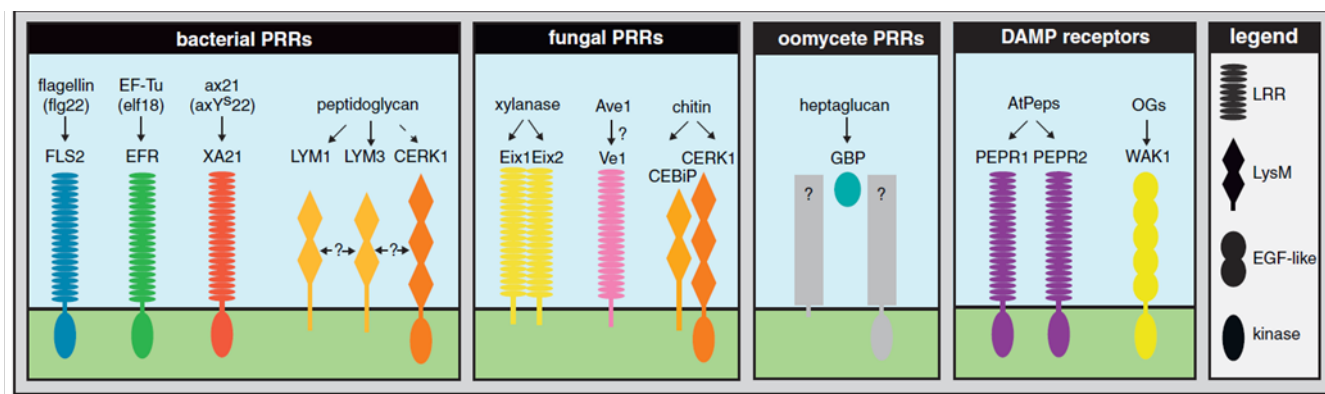


Figure I.19: Les récepteurs PRR et les MAMP et DAMP associés.

Le récepteur LRR-RLK FLS2 reconnaît la flagelline, un MAMP bactérien, ou l'épitope flg22, chez *Arabidopsis*, la tomate, *N. benthamiana* et le riz. Le récepteur LRR-RLK EFR des Brassinostéroïdes reconnaît le MAMP bactérien EF-Tu, ou l'épitope Elf18 du facteur d'élongation bactérien. Le récepteur LRR-RLK XA21 du riz reconnaît le peptide de type 1 de quorum-sensing Ax21, un MAMP bactérien. Les récepteurs LysM-RLP LYM1 et LYM3 fixent le peptidoglycane (PGN), un MAMP bactérien, avec plus forte affinité que le récepteur LysM-RLP CERK1. Bien que l'interaction n'ait pas été démontrée, il est possible que ces trois récepteurs s'associent et forment un complexe responsable de la reconnaissance du PGN chez *Arabidopsis*. Le PAMP fongique xylanase est reconnu par les récepteurs LRR-RLP Eix1 et Eix2 de la tomate. Bien que la fixation n'ait pas été démontrée, Ave1 serait le ligand de la protéine LRR-RLP Ve1 chez la tomate. Chez le riz, le récepteur LysM-RLP CEBP reconnaît la chitine et interagit avec le récepteur CERK1 pour initier la signalisation intracellulaire. Chez *A. thaliana*, l'interaction protéique entre CERK1 et CEBiP-like n'a pas été démontrée. Chez les Poacées, bien que le mécanisme d'interaction ne soit pas encore décrit, la protéine extracellulaire GBP (β -Glucan Binding Protein) reconnaît l'heptaglucon des oomycètes *Phytophthora*. Les récepteurs PEPR1 et PEPR2 reconnaissent les peptides endogènes AtPep d'*Arabidopsis thaliana*, et le récepteur WAK1, qui est composé d'un domaine de type EGF, est le récepteur des oligogalacturonides (OG), des produits de dégradation de la paroi végétale.

Abréviations: MAMP: Pathogen-associated molecular pattern; DAMP: Damage-associated molecular pattern; PRR: Pattern Recognition Receptor; LRR: Leucine-rich repeat; RLK: Receptor-Like Kinase; RLP: Receptor-Like Protein; EGF: Epidermal Growth Factor.

Monaghan and Zipfel, 2012

3.2.1.1.1. La flagelline

En cherchant des éliciteurs de défenses sur des cultures cellulaires de tomates à partir de surnageant de cultures cellulaires de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* souche 511 bouillies, Felix et ses collaborateurs ont identifié la flagelline (Felix et al., 1999). La flagelline est la principale sous-unité protéique du flagelle bactérien qui peut en contenir jusqu'à 20000 ; ce qui associe presque toujours cette molécule à la présence de bactéries (Chen et al., 2011). Dans l'étude proposée par Felix et ses collaborateurs, un motif peptidique de 22 acides aminés appelé flg22 suffit à éliciter des défenses immunitaires telles que l'alcalinisation du milieu ou la production rapide de FAO, et ce dès 2 pg de peptide. Chez *A. thaliana*, l'application de flg22 sur des plantules provoque également une forte réduction de la croissance (Felix et al., 1999). Afin d'identifier un récepteur, des tests d'inhibition de croissance sur les accessions Col-0, Ler et Ws d'*A. thaliana* ont été entrepris (Gómez-Gómez et al., 1999). Il s'est avéré que Ws est insensible au traitement flg22. Des croisements entre les accessions Ws et Col-0, ainsi qu'entre Ws et Ler, puis l'étude de ségrégation du phénotype de croissance réduite en descendance suite au traitement flg22 ont permis d'identifier un unique locus responsable du phénotype observé. Suite à cela, une banque de mutants EMS d'*A. thaliana* a été criblée en réponse à flg22. Le mutant *fls2*, pour *flagellin sensing 2*, dont la croissance n'est pas affectée par le traitement flg22, a été isolé et le gène *FLS2* identifié (Gómez-Gómez and Boller, 2000). Le gène *FLS2* code un récepteur PRR-RLK de type LRR qui reconnaît le domaine N-terminal conservé de la flagelline et qui est localisé au niveau de la membrane plasmique de tous les tissus de la plante, indépendamment du traitement flagelline. La conséquence de la liaison de la flagelline à *FLS2* est l'hétérodimérisation de *FLS2* et de la protéine BRI1-Associated Kinase (BAK1), provoquant une cascade de signalisation et initiant la mise en place de réponses immunitaires de la plante (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). La protéine BAK1, ou SERK3, est un récepteur PRR-RLK dont l'ECD est composé d'un nombre réduit de modules LRR. Initialement identifiée comme un interacteur de BRI1, un récepteur de brassinostéroïdes, la protéine BAK1 n'intervient pas dans la détection du MAMP mais dans le recrutement de *FLS2* au niveau de la membrane plasmique et permet l'amplification du signal intracellulaire (Li et al., 2002; Postel et al., 2010). L'hétérodimérisation des deux récepteurs entraîne leur phosphorylation ce qui permet d'enclencher la signalisation et la mise en place de la PTI (Roux et al., 2011). A l'hétérodimère formé par *FLS2* et BAK1, au niveau de la membrane plasmique, s'associe à BIK1 (Botrytis-Induced Kinase), une protéine qui fait partie d'une famille de kinases cytoplasmiques (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010). Suite à la liaison de la flagelline par *FLS2* et le recrutement de BAK1, BAK1 phosphoryle la protéine BIK1 qui assure ensuite la phosphorylation de *FLS2* et BAK1 (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010). Le mutant de perte de fonction *bik1* est d'ailleurs affecté dans sa

réponse immunitaire à flg22, à la chitine et à un autre MAMP bactérien elf18 issu de EF-Tu (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010).

La flagelline est un MAMP perçu par les végétaux supérieurs et par des espèces animales (Hayashi et al., 2001; Silipo et al., 2009). Chez les mammifères, le récepteur membranaire Toll-Like Receptor 5 (TLR5) de type PRR a été identifié comme le récepteur de la flagelline par co-immunoprécipitation (Smith et al., 2003). Les auteurs ont montré que TLR5 reconnaît spécifiquement une séquence de 13 acides aminés conservés de la flagelline, qui diffère de la séquence flg22 reconnue par FLS2. La liaison de la flagelline à TLR5 provoque l'activation du récepteur et permet la mise en place de réponses de l'immunité innée telles que l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor κ B) et la production de la glycoprotéine TNF α (Tumor Necrosis Factor α), deux protéines nécessaires à la réponse immunitaire de l'hôte (Hayashi et al., 2001).

3.2.1.1.2. La chitine

La chitine est un constituant majeur des parois fongiques qui déclenche des réponses de défense chez les végétaux mono- et dicotylédones ainsi que chez les animaux (Kombrink et al., 2011). La chitine est un polymère de *N*-acétylglucosamine dont un oligomère de 8 unités suffit à induire des réponses de défense telles que la production de phytoalexines ou encore la génération de FAO (Yamada et al., 1993; Kuchitsu et al., 1995). Chez les mammifères, la chitine est reconnue par différents récepteurs tels que le récepteur de mannose des macrophages ou TLR2 (Lee et al., 2008). Cette détection engendre des réponses de l'immunité innée et de l'immunité adaptative chez les mammifères.

Chez les plantes, l'existence d'un récepteur membranaire de la chitine a été montrée par la liaison à forte affinité d'oligomères de chitine radio-marqués à une protéine membranaire issue d'une culture cellulaire de riz (Ito et al., 1997). Cette protéine est nommée Chitin Oligosaccharide Elicitor-Binding Protein (CEBiP). La purification et l'identification de 32 acides aminés de la séquence N-terminale ont permis le clonage de l'ADNc correspondant (Kaku et al., 2006). L'étude du mutant de type ARN interférence (ARNi) a confirmé la perte d'éllicitation des défenses en l'absence de l'expression du gène *CEBiP* chez le riz (Kaku et al., 2006). Cette protéine membranaire est un récepteur PRR constitué d'un domaine ECD comportant deux motifs LysM responsables de la reconnaissance de la chitine. CEBiP étant un PRR-RLP, cette protéine ne possède pas de domaine kinase lui permettant la transmission intracellulaire du signal.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de transmission du signal chitine, cette équipe s'est tournée vers la plante modèle *Arabidopsis* afin d'identifier le récepteur de la chitine et la protéine responsable de la signalisation intracellulaire. De ce fait, Miya et al. ont recherché parmi une collection de mutants d'*Arabidopsis*, des mutants affectés dans des gènes codant des protéines à motif LysM. Ces mutants ont été criblés en se basant sur la perte de formation de FAO en réponse à la chitine (Miya et al., 2007).

Ainsi, le gène *CERK1* a été identifié comme un composant essentiel de la signalisation déclenchée par la chitine, et la protéine CERK1 s'est avérée être un intermédiaire indispensable à l'activation des défenses en réponse à ce MAMP. Chez *A. thaliana*, le récepteur PRR-RLK CERK1 se fixe à la chitine grâce à ses 3 motifs en tandem LysM, ce qui déclenche l'autophosphorylation de son domaine kinase intracellulaire et active les réponses de défense de la plante (Iizasa et al., 2009; Petutschnig et al., 2010; Liu et al., 2012).

Chez le riz, la protéine OsCERK1 est une protéine homologue de AtCERK1 (Shimizu et al., 2010). Les lignées cellulaires de riz n'exprimant pas le gène *OsCERK1* ne sont pas capables d'induire de réponse de défense en présence de chitine. Ce résultat indique que la protéine OsCERK1 est nécessaire à l'intégration du signal déclenché par la perception de la chitine. Les auteurs proposent que les récepteurs CEBiP et OsCERK1 pourraient s'associer en hétérodimère pour signaler la présence de chitine chez le riz (Shimizu et al., 2010).

3.2.1.2. Les DAMPs et récepteurs associés

Les DAMP sont des éliciteurs endogènes produits lorsque la cellule végétale est perturbée, comme c'est le cas lors d'une infection par un microorganisme pathogène (Monaghan and Zipfel, 2012). Dans la littérature, le rôle attribué aux DAMP est l'induction et l'amplification des réponses de défense lors de la détection d'un stress biotique (Yamaguchi and Huffaker, 2011). Parmi les DAMP, on trouve par exemple des fragments d'oligosaccharides issus de la dégradation de la paroi végétale ou des peptides issus de la dégradation de protéines végétales. Par exemple, chez *A. thaliana*, les récepteurs PRR PEPR1 et PEPR2 reconnaissent spécifiquement les peptides Pep1 et Pep2 issus de la plante elle-même, et la liaison du peptide au récepteur conduit à l'élicitation des défenses de la plante.

Un autre exemple que je vais présenter plus en détail est celui de la reconnaissance de produits de dégradation de la paroi végétale. Les homogalacturonanes sont des polysaccharides composés de résidus d'acides α -D-galacturoniques branchés en liaison β -1,4, qui assurent l'intégrité de la paroi végétale et la cohésion du tissu (Ridley et al., 2001). Lors de blessures ou sous l'action d'enzymes de

dégradation, les homogalacturonanes peuvent être fragmentés par dégradation en oligogalacturonides (OG). Pour la cellule végétale, la présence d'OG est perçue comme un signal de danger et induit l'expression de gènes de défense (Denoux et al., 2008). Les OG sont des molécules classées parmi les DAMP, Damage-Associated Molecular Pattern, qui génèrent un maximum d'éllicitation des défenses de la plante lorsque leur degré de polymérisation est entre 10 et 15 (Hematy et al., 2009). La protéine WAK1 a été proposée comme le récepteur des OG. WAK1 appartient à la famille protéique des Wall-Associated Kinase (WAK) pour laquelle *A. thaliana* possède un cluster de 5 gènes très proches (WAK1-WAK5) (Verica et al., 2003). Les protéines transmembranaires WAK sont situées au niveau de la membrane plasmique et possèdent un domaine ECD composé de répétition EGF-like et un domaine kinase intra-cytoplasmique (Anderson et al., 2001). La redondance des gènes WAK et les phénotypes de létalité obtenus chez des mutants affectés dans l'expression des gènes WAK ont empêché l'étude de mutants. Ceci a conduit à produire une lignée d'extinction inducible de l'expression du gène WAK1 par une approche ARNi. Le phénotype de cette lignée inducible *wak1* est similaire à celui de la plante sauvage (Wagner and Kohorn, 2001). Afin de déterminer si la protéine WAK1 reconnaît et intègre un signal extérieur, une expérience d'intervention de domaines (domain-swap) générant une protéine chimérique entre le récepteur PRR-RLK du MAMP bactérien EF-Tu et WAK1 chez *A. thaliana* a été réalisée (Brutus et al., 2010). Pour tester la reconnaissance des OG par WAK1, le domaine extracellulaire de WAK1 a été associé au domaine intracellulaire de FLS2 ou de EFR, et pour tester la capacité à initier la signalisation déclenchée par la perception de la flagelline ou EF-Tu, le domaine extracellulaire de FLS2 ou EFR respectivement a été associé au domaine intracellulaire de WAK1. Dans les deux cas de figure, l'éllicitation des défenses en réponse à la reconnaissance des OG ou du MAMP se produit *in vivo* chez *A. thaliana*, indiquant un rôle de WAK1 dans la reconnaissance des OG et la signalisation intracellulaire (Brutus et al., 2010).

Il est intéressant de noter qu'un phénomène analogue se produit chez les animaux. En effet, chez les animaux, le hyaluronane participe à l'intégrité cellulaire et tissulaire. Ce polysaccharide de la matrice extracellulaire est un polymère d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine liés alternativement par des liaisons β -1,4 et β -1,3 (Jiang et al., 2011). La dégradation du hyaluronane sous l'action d'enzymes spécifiques ou en conséquence d'une blessure génère des fragments qui sont reconnus par des récepteurs. Les récepteurs membranaires TLR2 et TLR4 reconnaissent ces produits de dégradation et déclenchent une signalisation cellulaire aboutissant à la mise en place de réponses inflammatoires et stimulant la réparation du tissu endommagé (Scheibner et al., 2006). Comme la perception des MAMP, la reconnaissance d'élliciteurs endogènes, ou DAMP, par des récepteurs spécifiques est un système de surveillance conservé à travers les règnes animal et végétal.

3.2.2. Les effecteurs microbiens et les molécules associées à la résistance de la plante

Les agents pathogènes qui arrivent à déjouer l'arsenal immunitaire lié à la PTI poursuivent le processus de colonisation et d'infection. A cet effet, certains microorganismes pathogènes délivrent des molécules appelées effecteurs et déclenchent l'ETS. Afin de permettre le déroulement du processus infectieux, ces effecteurs microbiens peuvent contribuer à limiter ou à éviter la PTI, favoriser la mise en place de structures d'infection, ou encore activer ou détourner des processus métaboliques de la cellule végétale.

Si la cellule végétale est capable de déclencher l'ETI suite à la reconnaissance de l'effecteur, l'agent pathogène qui délivre cet effecteur est qualifié d'avirulent. Parmi les réponses de défense mises en place au cours de l'ETI, la réponse hypersensible (HR, Hypersensitive Response) est souvent utilisée comme réponse caractéristique de ce processus biologique. La HR se manifeste par l'apparition d'une nécrose au site d'infection et résulte d'une mort cellulaire programmée. Si la plante n'est pas capable de percevoir et de reconnaître l'effecteur microbien, cela conduit à la maladie et le microorganisme responsable est qualifié de virulent (Jones and Dangl, 2006).

La perception ou la reconnaissance de l'effecteur microbien par la cellule végétale est réalisée par trois mécanismes principaux qui aboutissent à la résistance.

A travers des exemples, je vais présenter les stratégies de reconnaissance de l'effecteur et/ou de résistance par la cellule végétale. J'exposerai tout d'abord la reconnaissance des effecteurs par les récepteurs intracellulaires de type NB-LRR, puis les modifications de séquences nucléotidiques de l'ADN ciblées par l'effecteur et, enfin les modifications de séquences peptidiques de protéines ciblées par l'effecteur.

3.2.2.1. La reconnaissance de l'effecteur microbien par les récepteurs intracellulaires NB-LRR

Les récepteurs intracellulaires NB-LRR appartiennent à la famille des protéines STAND (Signal Transduction ATPase with Numerous Domains) dans laquelle se trouvent des régulateurs de l'immunité, de l'inflammation et de l'apoptose chez les animaux (Leipe et al., 2004). Les récepteurs NB-LRR sont considérés comme des protéines de résistance, nommées aussi R proteins. Un récepteur NB-LRR est composé de trois régions : une région N-terminale variable responsable de la reconnaissance spécifique du ligand, de la liaison à des partenaires protéiques et de l'initiation de la HR, une région centrale NB-ARC qui est un site de liaison de nucléotides, et une région C-terminale

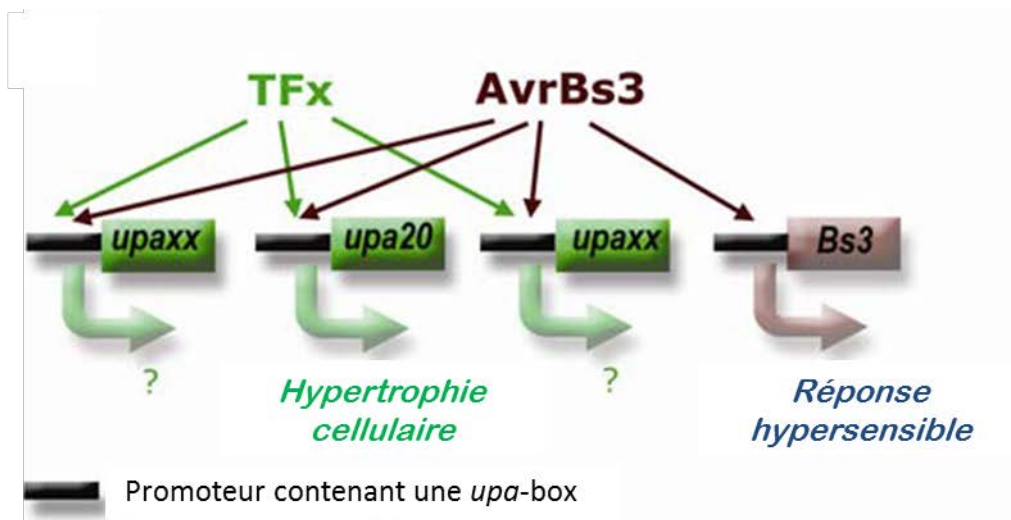


Figure I.20: Schéma de la stratégie de virulence de l'effecteur AvrBs3 de *X. campestris* et de la stratégie de résistance du poivron.

L'effecteur de type III AvrBs3 de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* se fixe sur des séquences promotrices conservées, nommées *upa*-box. Lors d'une interaction compatible, AvrBs2 provoque l'hypertrophie des cellules végétales en induisant l'expression de gènes *upa* (*upaxx*), dont le gène *upa20*. Lors d'une interaction incompatible, en plus des promoteurs des gènes *upa*, AvrBs3 se fixe au promoteur du gène de résistance *Bs3*, ce qui provoque une réponse hypersensible. AvrBs3 activerait l'expression de ces gènes en mimant un facteur de transcription de la plante (TFx), qui se fixerait également sur les *upa*-box, et induirait spécifiquement l'expression de *Bs3* pour aboutir à une mort cellulaire localisée au cours du développement de la plante.

Hogenhout *et al.*, 2009

composée d'un domaine LRR impliqué dans la signalisation (Elmore et al., 2011). La partie N-terminale peut être composée d'un domaine TIR (Toll-Interleukine 1 Receptor) ou d'un domaine coiled coil (CC). La région centrale NB-ARC doit son nom à la présence de ce domaine dans la protéine APAF-1 (Apoptotic protease-activating factor-1), les protéines R et la protéine CED-4 (*Caenorhabditis elegans* death-4 protein). Les récepteurs NB-LRR sont donc divisés en deux groupes : les récepteurs TIR-NB-LRR, aussi appelés TIR-NLR ou TNL, et les récepteurs CC-NB-LRR aussi appelés CC-NLR ou CNL.

Par exemple, lors de l'infection, le champignon pathogène *Bgh* produit puis sécrète des effecteurs dans les cellules de l'orge. Chez l'orge, il existe un locus polymorphe associé à la résistance nommé *MLA* codant des récepteurs CC-NLR capables de reconnaître les effecteurs spécifiques des différents isolats de *Bgh* (Seeholzer et al., 2010). Le récepteur nucléaire MLA10 est un homodimère qui reconnaît et se fixe spécifiquement à l'effecteur AVR_{A10} de *Bgh* (Shen et al., 2007). La perception de l'effecteur AVR_{A10} par le domaine CC de MLA provoque un changement de conformation du récepteur permettant alors le remplacement d'un ADP par un ATP au niveau du domaine central NB-ARC. La liaison de l'ATP par le domaine NB-ARC a pour conséquence un changement de conformation interne au niveau du domaine CC permettant d'initier l'association de MLA10 aux facteurs de transcription HvWRKY1 et HvWRKY2 et l'induction des réponses de défense telles que la mort cellulaire (Maekawa et al., 2011).

3.2.2.2. La production d'une cible mutée de l'effecteur microbien

3.2.2.2.1. L'effecteur microbien cible une séquence nucléotidique

Les bactéries du genre *Xanthomonas*, et certaines bactéries du genre *Ralstonia*, possèdent des effecteurs de type III nommés Transcription Activator-Like (TAL) qui, chez l'hôte végétal, sont capables de se lier aux promoteurs et d'activer la transcription de gènes qui seront favorables au développement de la bactérie pathogène (Schornack et al., 2013). Ces TAL possèdent dans leur partie N-terminale les signaux de sécrétion de type III et de translocation depuis la bactérie vers la cellule hôte et possèdent dans la partie C-terminale les séquences NLS permettant l'adressage nucléaire de la protéine ainsi qu'un domaine d'activation acide (AAD) requis pour l'activation des gènes cibles. Le motif de liaison à l'ADN des séquences promotrices des gènes cibles est localisé dans un domaine central formé de 33,5 séquences répétées, comportant chacune 33 à 35 acides aminés conservés. La spécificité de liaison entre l'effecteur et l'ADN du gène cible est gouvernée par les résidus 12 et 13 nommés Repeat-Variable Di-residues (RVD) qui forment un code de reconnaissance de la séquence

d'ADN cible. Ce code a été déchiffré et sa signification vérifiée permettant ainsi la prédiction de gènes cibles de TAL (Boch et al., 2009; Moscou and Bogdanove, 2009).

AvrBs3 est un effecteur de type III de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), qui participe à la pathogénie de la bactérie sur les plantes hôtes poivron et tomate en provoquant l'hypertrophie des tissus foliaires (Marois et al., 2002). Cet effecteur est un facteur de transcription de type TAL qui, chez le poivron, se fixe spécifiquement sur le promoteur de son gène cible *UPA20* (Figure I.20) (Kay et al., 2007). Le gène *UPA20* code un facteur de transcription de type bHLH impliqué dans la régulation de la taille des cellules. De ce fait, la reconnaissance du promoteur cible *UPA20* par AvrBs3 provoque les symptômes d'hypertrophie foliaire du poivron. Il existe des génotypes de poivrons résistants chez lesquels le promoteur du gène dit de résistance *Bs3* est également une cible du TAL AvrBs3, contrairement aux génotypes de poivrons sensible à Xcv. La liaison d'AvrBs3 au promoteur de *Bs3* provoque la transcription du gène *FMO* codant une flavine monooxygénase codée par *Bs3* et aboutit à une HR au site d'infection par Xcv (Roemer et al., 2007).

3.2.2.2.2. L'effecteur microbien cible une protéine

Il existe une autre stratégie de résistance de la plante hôte qui consiste à posséder une version mutée de la cible d'un effecteur microbien. Je propose d'illustrer cette stratégie de résistance à travers l'exemple de l'effecteur AvrBsT de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) et sa cible, la phospholipase SOBER1.

A. thaliana, n'est pas une plante hôte de Xcv. Cunnac et al. ont exprimé AvrBsT dans une bactérie pathogène d'*Arabidopsis*, *Pst*. DC3000 (Cunnac et al., 2007). En criblant une collection d'accension d'*A. thaliana* pour la résistance à *Pst* DC3000 exprimant AvrBsT (*Pst* DC3000 AvrBsT), les auteurs ont identifié l'accension Pi-0 comme le seul génotype résistant à la bactérie exprimant AvrBsT. Par clonage positionnel, le gène *SOBER1* (*Suppressor Of AvrBsT-Elicited Resistance 1*) a été cloné et identifié comme lié à la résistance d'*A. thaliana* à *Pst* DC3000 AvrBsT. Chez Pi-0, le gène *SOBER1* comporte une délétion d'un nucléotide conservé chez toutes les autres accessions dans la séquence codant le domaine α/β -hydrolase conservé de la protéine, ce qui provoque chez Pi-0 une mutation récessive de l'allèle *sober1-1*. Dans cette même étude, il a été mis en évidence que la protéine SOBER1 a une activité carboxylestérase ; activité caractéristique de la superfamille à laquelle cette protéine appartient (Cunnac et al., 2007). Afin de déterminer le substrat de SOBER1, le contenu en lipides de Pi-0 a été analysé (Kirik and Mudgett, 2009). Il s'est avéré qu'en présence de *Pst* DC3000 AvrBsT, les plantes Pi-0 accumulent de l'acide phosphatidique (PA) dans les feuilles. L'inhibition de l'activité phospholipase D (PLD), catalysant la production de PA à partir de phosphatidylcholine (PC),

ou la surexpression du gène *SOBER1* dans Pi-0 réduit la quantité de PA et inhibe la mort cellulaire dans les feuilles de Pi-0 inoculées avec *Pst* DC3000 AvrBsT (Kirik and Mudgett, 2009). *SOBER1*, dont l'activité phospholipase A2 est requise pour supprimer la mort cellulaire *in vitro*, est la cible de AvrBsT qui limite ainsi la production de PA dans la cellule végétale (Kirik and Mudgett, 2009).

Après avoir exposé les modalités de perception et de reconnaissance des microorganismes pathogènes par la cellule végétale, je vais maintenant présenter les composantes des réponses de défense des plantes.

3.2.3. Les conséquences de la reconnaissance: une réponse immunitaire adaptée.

Bien que l'intensité et la vitesse de la réponse soit plus importante au cours de l'ETI, l'arsenal défensif déployé pendant la PTI et l'ETI est similaire (Jones and Dangl, 2006).

3.2.3.1. La fermeture stomatique

La fermeture des stomates est une réponse qui se met en place très rapidement (1h à 2h) suite à la perception d'un microorganisme (Melotto et al., 2006). Melotto et ses collaborateurs ont montré que *aba3-1* et *ost1-2*, des mutants de biosynthèse et de perception de l'acide abscissique (ABA) d'*A. thaliana* respectivement, sont plus sensibles à l'infection par *Pst* DC3000 que le génotype sauvage. Ces résultats indiquent alors un rôle de l'ABA dans la fermeture stomatique en réponse à un stress biotique. D'autre part, chez le mutant *fls2* d'*A. thaliana* infecté par *Pst* DC3000, la capacité de fermeture des stomates est perdue, contrairement à ce qui est observé chez la plante sauvage (Zeng and He, 2010).

Chez *A. thaliana*, une étude récente a mis en évidence l'implication du gène *LOX1*, codant une lipoxygénase des cellules de garde, dans la fermeture stomatique consécutive à la perception d'un microbe (Figure I.21) (Montillet et al., 2013). Ces auteurs ont montré que les mutants *lox1-1* et *lox1-2* sont incapables d'induire la fermeture des stomates et sont plus sensibles à l'infection par *P. syringae* pv. *tomato* que la plante sauvage. De plus, des produits métaboliques issus de l'activité *LOX1*, tels que les oxylipines, permettent de déclencher la fermeture stomatique. Bien que les oxylipines soient des précurseurs de l'acide jasmonique, les auteurs affirment que l'application d'un traitement MeJA ne permet pas la fermeture stomatique (Montillet et al., 2013). Cette étude indique que la signalisation induite par la perception des MAMP dépend majoritairement de la voie SA et est relayée par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) MPK3 et MPK6. Contrairement à ce qui avait été observé précédemment, cette signalisation n'est que très peu relayée par l'acide

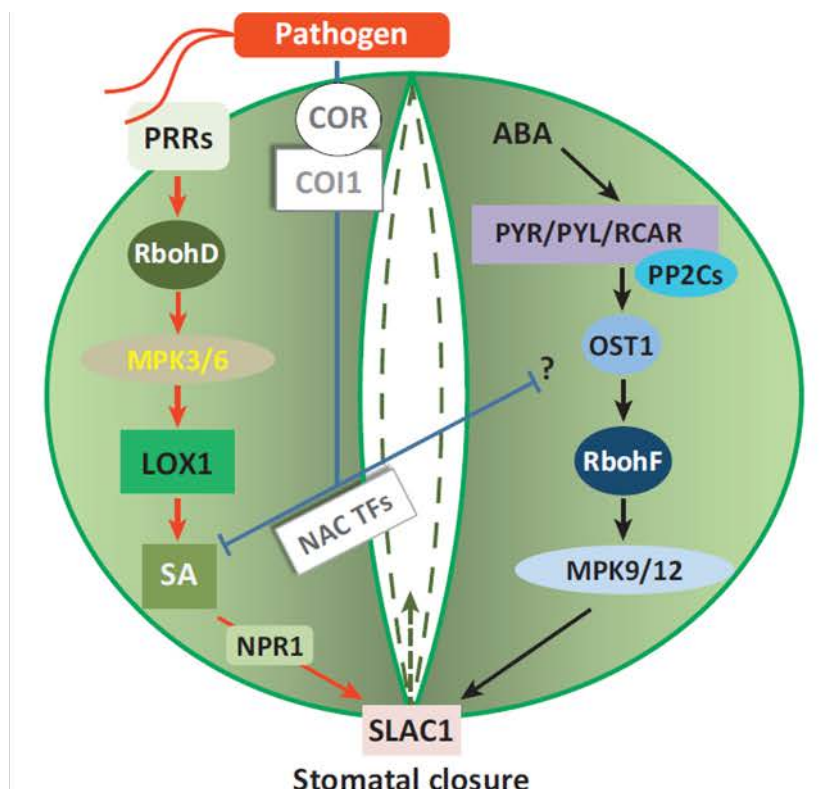


Figure I.21: La signalisation déclenchée par la perception d'un agent pathogène conduisant à la fermeture stomatique.

Lors d'une attaque par un microorganisme pathogène, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMP) activent des récepteurs spécifiques (PRR), ce qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la NADPH oxydase RbohD. En aval de cette reconnaissance, les deux protéines Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) MPK3 et MPK6 sont induites et activent la lipoxygénase LOX1 des cellules de gardes, permettant alors la peroxydation des acides gras poly-insaturés en acides gras hydroperoxydés et en oxylipines électrophiles activées (RES). Ces deux espèces sont des inducteurs potentiels de la fermeture des stomates. L'accumulation d'acide salicylique (SA) est contrôlée par la production d'oxylipine et est requise pour assurer la signalisation en aval *via* la protéine NPR1 (Non-Expressor of PR genes 1) et permettre l'activation du canal anionique SLAC1. Cette dernière étape participe à la fermeture stomatique. La voie de signalisation dépendante de l'ABA requiert le récepteur PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance/Pyrabactin-Like/Regulatory Components of ABA Receptor) qui fixe l'ABA puis séquestre la phosphatase PP2C, libérant la forme active de la protéine kinase OST1 (Open Stomata 1). L'interaction directe de OST1 avec la NADPH oxydase RbohF conduit à la production de ROS. L'activité des protéines MPK9 et MPK12, qui sont des régulateurs positifs de la génération des ROS en réponse à l'ABA, est amplifiée par le peroxyde d'hydrogène. SLAC1 est nécessaire à l'induction de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA et à un signal d'origine biotique. Des données récentes suggèrent que la régulation de la réponse de l'ABA aux stress biotiques résulterait du contrôle de la synthèse de canaux ioniques et d'ATPase par l'ABA, qui interviendraient dans l'ajustement de la pression osmotique des cellules de garde. La coronatine (COR), un facteur de virulence des bactéries du genre *Pseudomonas*, est reconnu par le récepteur COI1 (Coronative Insensitive 1) et induit l'ouverture stomatique *via* l'action de trois facteurs de transcription NAC. COR inhibe indirectement l'accumulation de SA et la voie de signalisation de l'ABA ce qui suggère que les mécanismes dépendants de SA et de ABA doivent être bloqués pour que l'ouverture stomatique se produise.

abscissique (ABA), la phytohormone clef pour la régulation de la pression osmotique des cellules de garde (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013).

3.2.3.2. La synthèse et l'accumulation de phytoalexines

Les phytoalexines sont des espèces chimiques du métabolisme secondaire, de faibles poids moléculaire, synthétisées et accumulées par la plante après une confrontation avec un agent pathogène ou en conséquence de la reconnaissance d'un MAMP (Ahuja et al., 2012). Ces métabolites secondaires participent aux réponses de défense des plantes grâce à leurs propriétés antimicrobiennes (Ahuja et al., 2012).

A. thaliana possède une seule phytoalexine, la camalexine, qui est un indole dérivé du tryptophane, produite également chez d'autres espèces de la famille des Brassicacées. Le rôle de la camalexine dans l'immunité a été montré en étudiant la réponse du mutant d'*A. thaliana* déficient en phytoalexine. Ce mutant, nommé *pad3*, est plus sensible à l'infection par les champignons nécrotrophes *Alternaria brassicicola* et *B. cinerea* indiquant que la camalexine est nécessaire à la résistance de la plante contre ces agents pathogènes (Thomma et al., 1999). Le gène *PAD3* code une protéine cytochrome P450 mono-oxygénase putative qui catalyse la dernière étape de biosynthèse de camalexine à partir de l'acide dihydrocamalexique (DHCA) (Schuhegger et al., 2006). Chez *A. thaliana* en condition d'infection par *B. cinerea*, les gènes de biosynthèse de la camalexine sont régulés par des cascades MAPK impliquant MPK3 et MPK6 et l'activation consécutive du facteur de transcription WRKY33 (Ren et al., 2008; Mao et al., 2011).

3.2.3.3. Le renforcement des parois végétales

Conséquemment à la présence de microorganismes au contact de la plante, un renforcement localisé de la paroi végétale peut se produire et se manifester par une lignification, la réticulation des glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP), ou encore par le dépôt de callose (Hückelhoven, 2007). Sur la plante *A. thaliana* qui n'est pas un hôte des bactéries *P. syringae* pv. *glycinea* et *P. syringae* pv. *phaseolicola*, il a été montré que ces bactéries se multiplient davantage sur les mutants *pal1* et *pal2*, affectés notamment dans la biosynthèse de la lignine, que sur le génotype sauvage (Mishina and Zeier, 2007). Ces résultats suggèrent un rôle de la lignification dans la résistance dite "non-hôte" de la plante.

En réponse aux stress biotiques et abiotiques, le gène *PMR4* (ou *GSL5* ou *CalS12*) code une callose synthétase impliquée dans la production de callose, un homopolymère linéaire de résidus β -1,3-glucose branchés en liaison β -1,6, (Chen and Kim, 2009). Une étude a montré que le mutant *pmr4*

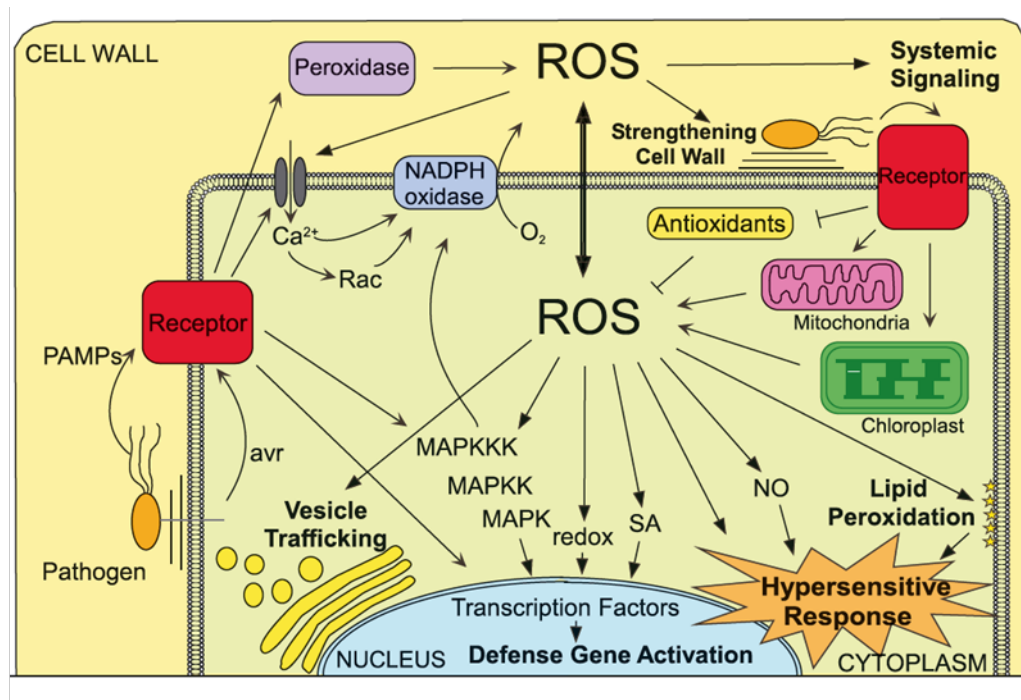


Figure I.22: La production et la signalisation relayée par les formes actives de l'oxygène lors de la perception d'un agent pathogène.

La perception d'un MAMP ou d'un agent pathogène induit la production extracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) *via* l'activation de peroxydases et de l'activité NADPH oxydase dépendante d'un signal calcique. Les ROS produites sont impliquées dans le renforcement pariétal de la cellule ainsi que dans la propagation d'un signal systémique et d'un signal intracellulaire. En effet, la présence de ROS apoplastiques favorise la présence de ROS cytoplasmiques. Les ROS cytoplasmiques sont générées par les mitochondries et les chloroplastes, et cette production est limitée par des molécules anti-oxydantes. Les ROS cytoplasmiques provoquent la peroxydation des lipides membranaires et l'accumulation d'oxyde nitrique (NO), ce qui peut, dans certains cas, conduire à une réponse hypersensible de la cellule. D'autre part, l'augmentation des ROS cytoplasmiques favorise le trafic vésiculaire. La présence de ROS dans le cytoplasme active également les voies de signalisation dépendantes des modules MAPK et de l'acide salicylique, et des réactions d'oxydo-réduction, ce qui a pour conséquence l'activation de facteurs de transcription responsables de l'expression de gènes de défense.

Torres, 2010

d'*A. thaliana* produit moins de callose lors d'une infection par l'oïdium ou en conséquence d'une blessure (Vogel and Somerville, 2000). Les onze autres gènes codant des calloses synthétases ne compensent pas la perte fonctionnelle de PMR4 (Nishimura, 2003). Il a également été montré que les MAMP flagelline et chitosan déclenchent tous deux des dépôts de callose (Luna et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont constaté une corrélation entre les dépôts de callose déclenchés par des MAMP et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Grâce à des méthodes d'analyses quantitative et qualitative des niveaux d' H_2O_2 , une accumulation d' H_2O_2 antérieure à l'apparition des dépôts de callose générés par les traitements flg22 et chitosan a été mise en évidence (Luna et al., 2011).

La paroi cellulaire est composée de quatre classes de protéines : les extensines, les glycoprotéines riches en hydroxyproline (proline/hydroxyproline rich glyco-protein, P/HRGP), les arabinogalactanes et les lectines des Solanacées (Deepak et al., 2010). La réticulation des HRGP en réponse à un stress biotique a pour conséquence de rendre ces protéines insolubles (Deepak et al., 2010). L'éllicitation du soja par une souche bactérienne *P. syringae* pv. *glycinea*, qui comporte le gène d'avirulence *AvrC*, rend insoluble deux protéines structurales de la paroi des cellules : p33 et p100 (Brisson et al., 1994). Lorsque cette expérience est réalisée avec une souche virulente de *P. syringae* pv. *glycinea*, ces protéines de la paroi demeurent solubles.

3.2.3.4. La génération de formes actives de l'oxygène

Comme cela vient d'être évoqué, des FAO sont produites suite à la perception de l'agent pathogène. Ces FAO sont à la fois des molécules toxiques pour les microbes et des éléments de la signalisation végétale qui assurent la mise en place de réponses défensives telles que l'apposition de callose pariétale (Daudi et al., 2012). Il existe différentes FAO qui sont les radicaux superoxydes O_2^- , le radical hydroxyl OH^\cdot , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le monoxyde d'azote NO.

Dans la majorité des interactions entre les plantes et microorganismes pathogènes, des NADPH oxydases du type Respiratory Burst Oxidase Homologue (RBOH) chez les plantes, seraient la source de la production massive et rapide de FAO (Figure I.22) (Torres and Dangl, 2005). Ces protéines de la membrane plasmique génèrent des FAO en catalysant l'oxydation d'un NADPH qui produit du $NADP^+$, de l' O_2^- et d'un H^\cdot . La dismutation de l'ion O_2^- produit du peroxyde d'hydrogène. Chez *A. thaliana*, les protéines NADPH oxydases D et F, codées par les gènes *AtRbohD* et *AtRbohF* respectivement, sont nécessaires à l'accumulation de FAO lors d'infections par des bactéries et d'oomycètes pathogènes, ainsi qu'en réponse à la reconnaissance d'un MAMP (Torres et al., 2002; Zhang et al., 2007). L'extinction de l'expression des gènes par stratégie anti-sens a mis en évidence l'implication du gène

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

Tableau I.1: Les familles de protéines Pathogenesis-Related (PR).

Van Loon, 2006

NtRbohD dans la production de FAO en réponse à l'infection par *Phytophthora infestans* chez le tabac et des gènes *NbRbohA* et *NbRbohB* chez *N. benthamiana* (Simon-Plas et al., 2002; Yoshioka et al., 2003). Ces expériences montrent que l' O_2^- généré directement et l' H_2O_2 indirectement produit par l'activité enzymatique de ces protéines assurent une partie de la résistance de la plante face aux infections par ces agents pathogènes.

En réponse aux stress biotiques, une autre source de FAO a été décrite. Les mutants *prx33* et *prx34* d'*A. thaliana*, défectueux pour l'expression de peroxydases de classe III, ont été étudiés pour leurs réponses aux MAMP (Daudi et al., 2012). Il est apparu que ces mutants présentaient une réduction de la quantité de FAO produites. Cette modification s'accompagne d'une sensibilité accrue des mutants à l'infection par *Pst* DC3000, en comparaison avec les plantes sauvages, qui est corrélée avec une perturbation de l'activation des gènes de défense et un défaut d'accumulation de glucosinolates (Daudi et al., 2012). Les peroxydases PRX33 et PRX34 sont donc impliquées dans la production de FAO en réponses aux stress biotiques.

3.2.3.5. La production de protéines de type PR

La reconnaissance d'un agent pathogène provoque l'induction de la synthèse de protéines de type PR (Pathogenesis-Related) aux propriétés antimicrobiennes intervenant dans les réactions de défense et qui sont ubiquitaires chez les plantes (Tableau 1) (van Loon et al., 2006). Les fonctions biologiques des 17 familles de protéines PR sont variées. Par exemple, des fonctions de dégradation des parois fongiques sont trouvées chez les endochitinases PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11. D'autres protéines, telles que l'endoprotéase PR-7 de la tomate, assurent des fonctions biochimiques qui visent à limiter l'invasion par un plus large spectre d'agents pathogènes. Malgré l'importance de ces protéines dans les réponses de défense des plantes, certaines d'entre elles ont des fonctions inconnues, comme les protéines PR-1 par exemple. Chez *A. thaliana*, sur les 22 gènes *PR-1*, l'expression d'un seul gène *PR-1* (At2g14610) est activée par un stress biotique (van Loon et al., 2006). Chez les plantes, il a été mis en évidence que tous les gènes *PR-1* sont régulés positivement par le SA, et que le SA est à la fois suffisant et nécessaire pour induire l'expression des gènes *PR-1* (Vernooij et al., 1994). De ce fait, les gènes *PR-1* sont largement employés dans les études expérimentales comme marqueur de l'activation de la voie SA (van Loon et al., 2006). Récemment, la fonction protéique d'une protéine de la famille PR-1 a été identifiée chez le mollusque *Conus textile* (Milne et al., 2003). Chez ce coquillage venimeux, la protéine Tex31 possède une activité protéolytique.

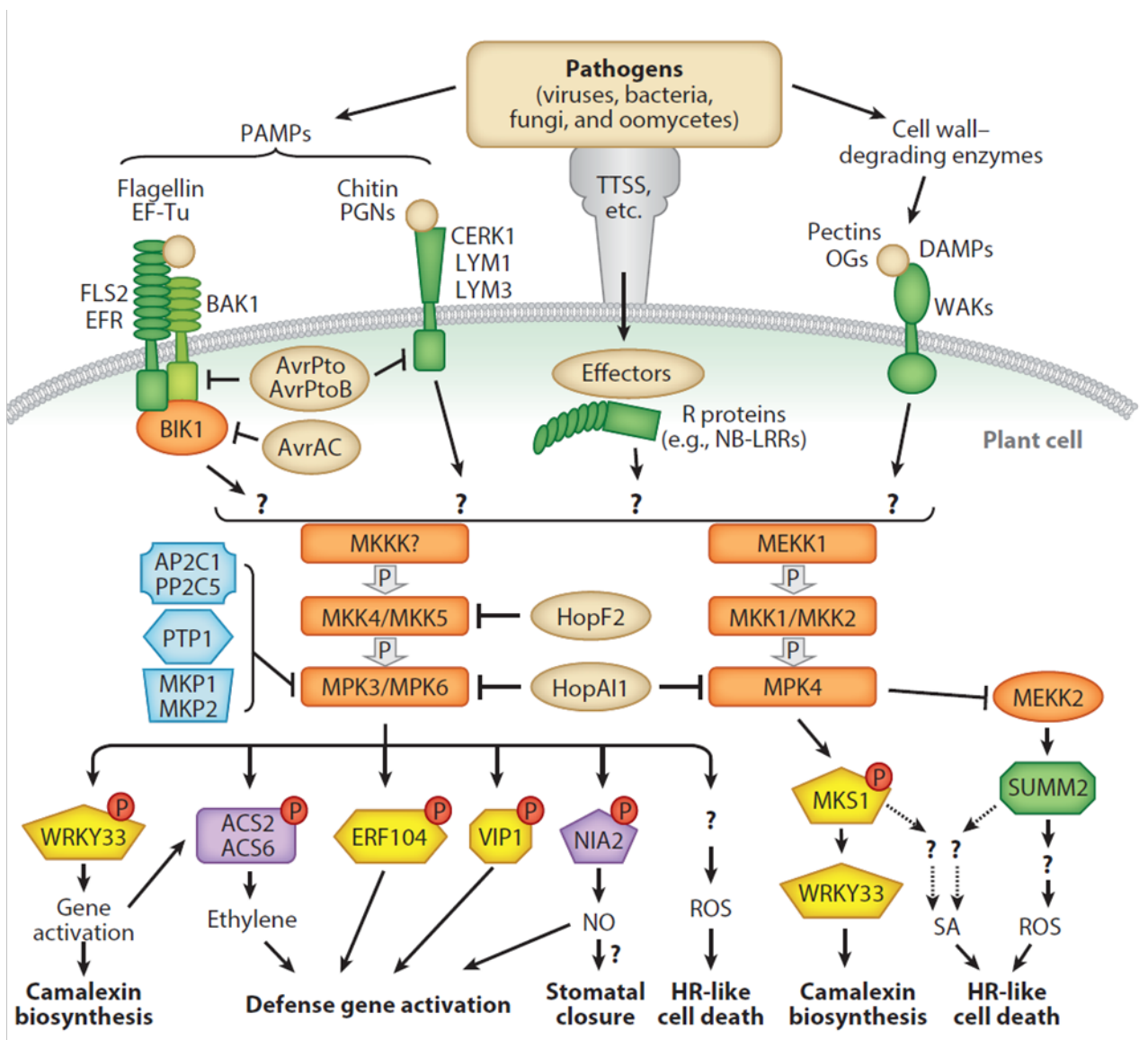


Figure I.23: La signalisation déclenchée par la cellule végétale suite à la perception du microbe.

Les récepteurs de la membrane plasmique PRR (Pattern Recognition Receptor) reconnaissent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (MAMP) et les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP), et cette reconnaissance déclenche des réponses immunitaires (PTI: Pattern-Triggered Immunity). De plus, l'agent pathogène peut délivrer des effecteurs dans la cellule végétale pour supprimer ses réponses immunitaires. Les plantes utilisent des protéines de résistance (R) pour détecter la présence de ces effecteurs, ce qui déclenche des réponses immunitaires (ETI: Effector-Triggered Immunity). L'activation des cascades MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) est une des réponses précoces de la PTI et de l'ETI. Les effecteurs microbiens suppriment les défenses de la plante en inactivant la cascade MAPK ou en supprimant sa signalisation en ciblant les récepteurs PRR par exemple. Les phosphatases, qui peuvent déphosphoryler et inactiver les MAPK, sont également des régulateurs importants de l'amplitude, de la durée et de l'issue physiologique de l'activation des MAPK.

Meng and Zhang, 2013

3.2.3.6. La mort cellulaire programmée

Les réponses immunitaires déclenchées par la perception d'un effecteur *via* des protéines de résistance sont souvent associées à un phénomène de mort d'un petit nombre de cellules végétales. Cette réaction, qui a souvent lieu pendant l'ETI, est la HR. Le mécanisme sous-jacent à cette mort programmée est encore mal compris mais présente des similarités avec le processus apoptotique existant chez les animaux. Les protéines de type caspases sont des protéases à cystéines impliquées dans l'accomplissement de l'apoptose dans le règne animal (Lord and Gunawardena, 2012). Chez *A. thaliana* inoculée par la bactérie avirulente *Pst* DC3000 *AvrRpm1*, un inhibiteur de caspase-3 inhibe la HR (Hatsugai et al., 2009). Ce qui est surprenant, c'est que l'activité enzymatique de type caspase n'a pas été identifiée chez les végétaux bien que l'activité caspase-like semble nécessaire à l'exécution de la HR (Hatsugai et al., 2009). Cette étude montre également que, dans ce contexte infectieux, la HR implique une fusion membranaire entre le tonoplaste et la membrane plasmique. La sous-unité B1 du protéasome PBA1, assure cette fusion membranaire permettant alors le relargage de molécules antimicrobiennes dans l'apoplaste et participant à ralentir la prolifération du microorganisme et à favoriser la HR (Hatsugai et al., 2009).

3.2.3.7. La signalisation déclenchée par la cellule végétale suite à la perception du microbe

La perception d'un agent microbien par détection d'un MAMP provoque la mise en place d'un certain nombre de réponses immunitaires. La détection du MAMP par la cellule végétale déclenche une cascade de signalisation qui implique plusieurs acteurs moléculaires décrits ci-après.

3.2.3.7.1. La perception des MAMP est relayée par des événements de phosphorylation et de déphosphorylation.

Chez les végétaux, ainsi que chez les levures et dans le règne animal, il existe la famille protéique des MAPK qui est particulièrement impliquée dans la transduction cellulaire de signaux extérieurs. Les protéines MAPK sont organisées et hiérarchisées au sein de modules de signalisation. Il existe trois niveaux d'organisation principaux selon l'ordre de phosphorylation et d'activation des protéines les unes par rapport aux autres (Meng and Zhang, 2013). Ce sont les MAPKKK ou MAP3Kinases qui intègrent initialement la signalisation en étant phosphorylées sur des résidus Thr et Tyr, ce qui active leur fonction kinase. Ainsi, une MAP3K activée peut phosphoryler les résidus Ser et Thr d'une MAPKK ou MAP2Kinase provoquant son activation. La MAP2K active phosphoryle à son tour une MAPK, ce qui provoque son activation et lui permet de phosphoryler une protéine cible. Chez *A. thaliana*, il existe 80 MAP3K, 10 MAP2K et 20 MAPK (Pitzschke et al., 2009).

En aval de la perception de la flagelline par le récepteur FLS2, deux modules MAPK ont été identifiés (Figure I.23). Le premier implique MKK4 et MKK5, et MPK3 et MPK6 ; le second comprend la MEKK1, MKK1 et MKK2, et MPK4 (Asai et al., 2002; Suarez-Rodriguez et al., 2007). En réponse à la flagelline, l'activation de ces modules de signalisation permet l'expression de gènes de défense.

Suite à la perception d'un MAMP, l'activation de MPK6 par phosphorylation provoque la rupture de l'interaction nucléaire entre MPK6 et ERF104. Le facteur de transcription ERF104 est alors libéré et peut activer l'expression de gènes de réponse à l'éthylène impliqués dans l'immunité (Bethke et al., 2009). De plus, Liu et Zhang ont montré qu'ACS2 et ACS6, deux enzymes de biosynthèse de l'éthylène, sont des cibles directes de MPK6 (Liu and Zhang, 2004).

Une autre illustration de l'importance des modules MAPK dans la signalisation d'un stress biotique est l'exemple de l'interaction protéique MPK4-WRKY33-MKS1. Dans le noyau, cette interaction constitutive est perturbée suite à la phosphorylation de MPK4 en présence d'un MAMP. Effectivement l'activation de MPK4 conduit cette kinase à phosphoryler son partenaire MKS1 provoquant ainsi la libération du facteur de transcription WRKY33. WRKY33 active alors la transcription de *PAD3*, un gène impliqué dans la biosynthèse de la camalexine, une phytoalexine toxique pour les microorganismes (Qiu et al., 2008).

Outre les phosphorylations assurées par les protéines kinases, les événements de déphosphorylation sont également des acteurs de la signalisation. Dans le cadre de la mise en place de la réponse immunitaire, peu de phosphatases ont été identifiées. Chez le mutant *mkp1* d'*A. thaliana*, n'exprimant plus la protéine MAP Kinase Phosphatase (MKP1), la PTI déclenchée par le MAMP bactérien elf26 est plus intense que celle observée chez la plante sauvage *Ws*, et ce mutant est plus résistant à l'infection par *Pto* DC3000 que *Ws* (Anderson et al., 2011). Ces auteurs proposent alors MKP1 comme un régulateur négatif des défenses induites par la perception des MAMP et relayées par MPK6.

3.2.3.7.2. La perception des MAMP engendre des flux calciques.

La perception d'un MAMP provoque la formation d'un flux d'ions Ca^{2+} depuis l'apoplasme vers le cytoplasme (Monaghan and Zipfel, 2012). L'activation par phosphorylation de récepteurs PRR provoque l'activation de canaux calciques de la membrane plasmique (Qi et al., 2010). Un flux calcique est alors généré et est à l'origine d'une signalisation impliquant notamment la production de FAO et la fermeture des stomates (Nomura et al., 2008; Ogasawara et al., 2008). Cette variation de concentration en calcium cytoplasmique est perçue par des protéines kinases dépendantes du calcium, ou CDPK, qui sont des intermédiaires nécessaires à l'établissement d'une réponse immunitaire déclenchée par les MAMP chez *A. thaliana* (Boudsocq et al., 2010). Chez le riz, il a été

montré que les calcineurine B-like (CBL) sont requises pour la perception du Ca^{2+} , les CBL activent des CBL-interacting protein kinases (CIPK) assurant une partie de la signalisation PTI (Kurusu et al., 2010).

3.2.3.7.3. Les petits ARN contribuent à la transduction du signal MAMP

MiR393 est le premier miARN identifié dont l'expression est induite en réponse au peptide flg22 chez *A. thaliana*. Navarro et al. ont montré que la répression de la signalisation de l'auxine provoque une diminution de la croissance de la bactérie *Pst* DC3000 lors de l'infection d'*A. thaliana* (Navarro et al., 2006). Cette répression est assurée par miR393 qui régule négativement les ARN messagers *TIR1*, *AFB2* et *AFB3*, dont les protéines sont impliquées dans la signalisation de l'auxine. En régulant négativement les ARN messagers *TIR1*, *AFB2* et *AFB3*, dont les protéines sont impliquées dans la signalisation de l'auxine, miR393 provoque une diminution de la croissance du pathogène *Pst* DC3000 (Navarro et al., 2006). D'autre part, il a été observé que chez les mutants *ago1* et *dcl1*, les réponses de défense sont plus faiblement induites que chez la plante sauvage (Li et al., 2010). Les gènes *AGO1* et *DCL1* codent des protéines impliquées dans le clivage des ARN messagers conduisant à la formation de petits ARN. Ces résultats permettent d'attribuer un rôle positif de AGO1 et DCL1 dans la mise en place de la signalisation PTI et l'implication de petits ARN pour aboutir à une défense efficace contre les stress biotiques (Li et al., 2010).

3.2.3.7.4. Les phytohormones sont une composante essentielle de la mise en place des défenses induites par la reconnaissance d'un agent pathogène

Les hormones sont des acteurs moléculaires clefs dans la coordination du développement, de la croissance, et de l'intégration des facteurs environnementaux et l'établissement de réponses adaptées (Pieterse et al., 2012). Ainsi lors d'un stress biotique, les phytohormones sont une composante essentielle de l'immunité des végétaux. L'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA) sont les hormones principales qui participent à la régulation des réponses de défenses des plantes lors de la PTI et de l'ETI (Pieterse et al., 2012). Au cours de mon travail de recherche je me suis particulièrement intéressée à l'implication de ces deux hormones dans la réponse des plantes aux sidérophores. De ce fait, après une courte présentation de la contribution des autres hormones végétales dans la réponse immunitaire des plantes, je vais présenter de manière plus approfondie la biosynthèse et la signalisation dépendante du SA et JA dans un contexte de stress biotique.

○ L'auxine

L'auxine est une phytohormone, synthétisée à partir du tryptophane, impliquée dans le développement de la plante (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Lors d'une attaque par un agent pathogène, la voie de signalisation de l'auxine peut interagir avec les voies de signalisation du SA et du JA (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Différentes études ont mis en évidence une relation

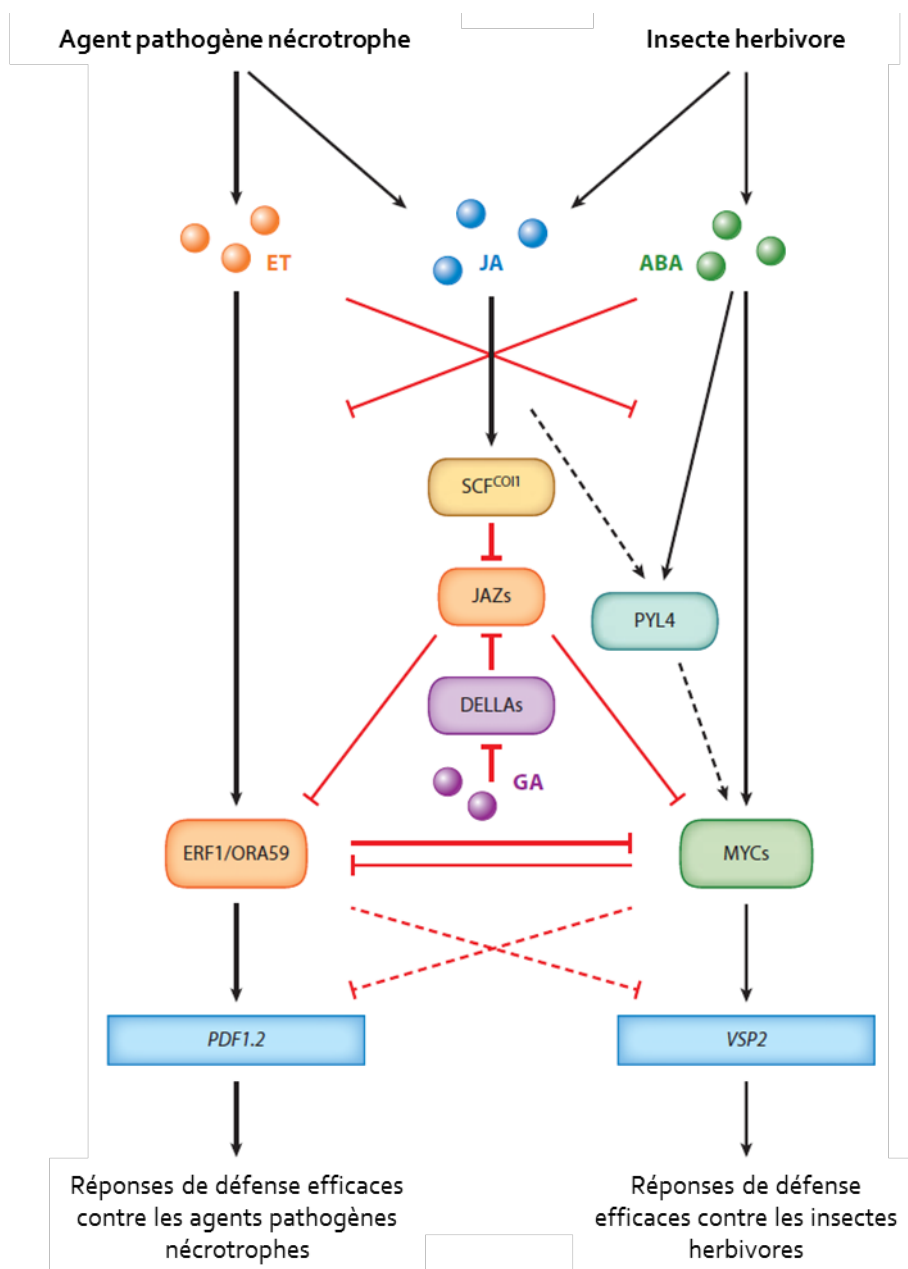


Figure I.24: La régulation croisée des voies hormonales du jasmonate, de l'éthylène, de l'acide abscissique et des gibbérelines.

Dans la plante, les microorganismes pathogènes nécrotrophes induisent des voies de signalisation dépendantes de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) qui aboutissent à la mise en place de réponses de défense efficaces contre ces agents pathogènes. Les insectes herbivores induisent également des voies de signalisation dépendantes de JA et de l'acide abscissique (ABA). Les voies ET et ABA dépendantes de la signalisation JA sont mutuellement antagonistes. Les traits pleins représentent les interactions démontrées expérimentalement et traits en pointillés représentent des interactions hypothétiques.

Modifié d'après Pieterse *et al.*, 2012

antagoniste entre auxine et SA. Par exemple, l'une de ces études a montré une suppression de l'expression de *PR1* en réponse à un traitement à l'auxine de plante d'*A. thaliana* (Park et al., 2007a). Il est intéressant de noter que l'auxine est une hormone produite également par les microorganismes, et qu'il est possible que certains agents pathogènes produisent de l'auxine afin d'inhiber les réponses de défense dépendantes de la voie SA (Pieterse et al., 2012). D'autre part, Navarro et al. ont montré l'induction du miR393 durant la PTI générée par un traitement flagelline, qui a pour conséquence de réprimer de façon globale l'expression des gènes de réponse à l'auxine (Navarro et al., 2006). Les auteurs émettent l'hypothèse que ce mécanisme préviendrait l'inhibition par l'auxine de la voie SA et permettrait ainsi la mise en place de réponses immunitaires.

○ *Les gibbérellines*

Les gibbérellines (Ga) sont des hormones impliquées dans la régulation de la croissance des cellules végétales (Robert-Seilaniantz et al., 2011). L'activation de l'expression des gènes de réponse aux Ga dépend de facteurs de transcription PIF de type bHLH. En absence de Ga, les protéines DELLA interagissent avec les facteurs de transcription PIF, ce qui empêche la transcription des gènes de réponses aux Ga (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Lorsque les Ga sont présentes dans la cellule, les répresseurs DELLA interagissent avec *GID1*, le récepteur des Ga, ce qui conduit au recrutement du protéasome et la dégradation des protéines DELLA. Ainsi, la répression transcriptionnelle exercée par les protéines DELLA sur les gènes de réponse aux Ga est levée, et la signalisation Ga peut se mettre en place (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Chez des mutants d'*A. thaliana* qui ne produisent plus de protéines DELLA fonctionnelles, un plus fort niveau de résistance a été observé lors de l'infection par *Pst* DC3000, en comparaison au niveau observé chez les plantes sauvages (Achard et al., 2003; Navarro et al., 2006). Cette résistance est corrélée avec une augmentation d'intensité de réponse de la voie SA et un affaiblissement de la voie de signalisation dépendante du JA (Figure I.24). D'autre part, l'accumulation des protéines DELLA provoque une induction de la voie de signalisation dépendante du JA (Hou et al., 2010). En effet, il est apparu que les protéines DELLA sont capables de se fixer à la protéine JAZ1, un répresseur de la signalisation dépendante du JA. Cette interaction entre les protéines DELLA et JAZ provoque alors la transcription des gènes de réponse au JA dans le cadre d'une interaction biotique (Navarro et al., 2006).

○ *Les cytokinines*

Les cytokinines (CK) sont des phytohormones impliquées dans le développement, en particulier dans les processus de division cellulaire (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Bien que le rôle des CK dans les interactions biotiques soit assez peu connu, il a été montré à travers des études de mutants et de lignées transgéniques d'*A. thaliana* qu'une accumulation de CK est corrélée avec une résistance accrue à *Pst* DC3000 (Choi et al., 2010). Cette résistance s'accompagne d'une induction de la

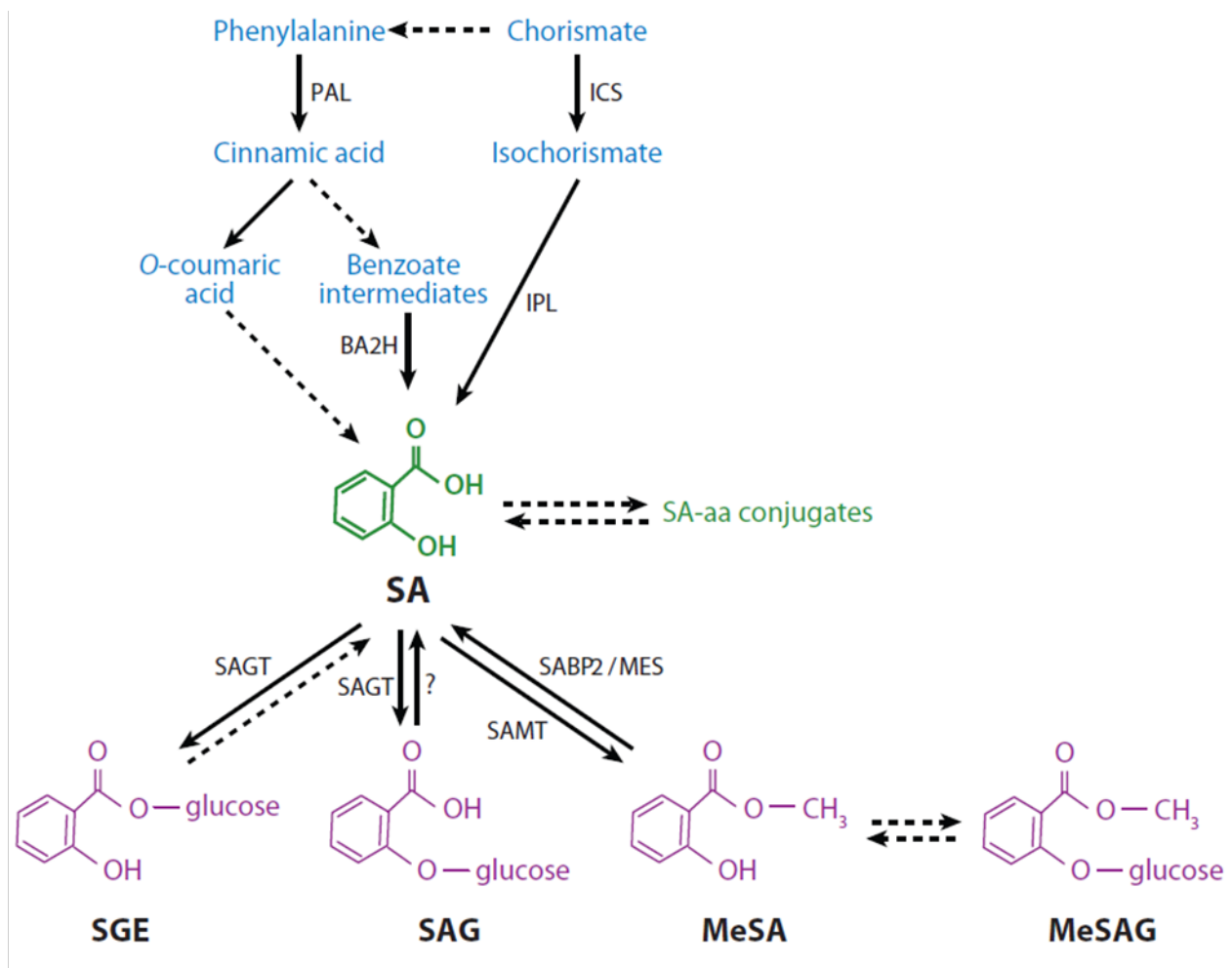


Figure I.25: La biosynthèse de l'acide salicylique chez les plantes.

Dans le chloroplaste, le SA est synthétisé par deux voies enzymatiques distinctes qui ont pour précurseur le même métabolite primaire, le chorismate, un intermédiaire de la voie des phénylpropanoïdes. Ces deux voies de synthèse passent par la synthèse d'un intermédiaire qui est la phénylalanine ou l'isochorismate. La première étape de synthèse du SA *via* la phénylalanine est assurée par l'enzyme Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) qui génère l'acide cinnamique à partir de phénylalanine. Ensuite, l'acide cinnamique est hydroxylé en *O*-coumarate puis oxydé pour produire du SA, ou alors l'acide cinnamique est oxydé produisant un intermédiaire benzoïque puis hydroxylé en formant du SA. La biosynthèse de SA *via* l'isochorismate est assurée premièrement par la conversion du chorismate en isochorismate catalysée par l'isochorismate synthétase (ICS), puis par l'intervention d'une isochorismate pyruvate lyase (IPL) pour produire du SA. Pour éviter les effets cytotoxiques liés à une trop grande quantité de SA intracellulaire, une fois synthétisé, le SA est converti en SA *O*-β-glucoside (SAG), ou en salicyloyl glucose ester (SGE), ou en méthyl salicylate (MeSA) ou encore en MeSA *O*-β-glucoside (MeSAG).

Modifié d'après Vlot *et al.*, 2010

biosynthèse de SA. A l'inverse, un faible niveau de CK dans les cellules d'*A. thaliana* entraîne une plus grande sensibilité à l'infection par *Pst* DC3000 (Choi et al., 2010).

○ *L'acide abscissique*

L'ABA est une hormone ayant un rôle dans les processus développementaux, en particulier sur le contrôle de la germination, mais aussi pour la résistance aux stress abiotiques (Robert-Seilanianz et al., 2011). Dans le cadre d'interactions compatibles en présence d'agents pathogènes nécrotrophes, il a été montré que l'ABA régule négativement les défenses de la voie de signalisation JA (Figure I.24). C'est le cas chez la tomate où l'étude du mutant *sitiens*, incapable de produire de l'ABA, a montré une résistance accrue du mutant aux infections par les agents pathogènes *B. cinerea*, *D. dadantii* et *P. syringae* pv. *tomato* (Audenaert et al., 2002; Asselbergh et al., 2007). Chez les plantes *A. thaliana* prétraitées avec de l'ABA, une augmentation de la résistance a été observée en réponse à l'infection par les microorganismes nécrotrophes *A. brassicicola* et *Plectosphaerella cucumerina* (Ton et al., 2009).

○ *Les brassinostéroïdes*

Comme cela a été présenté précédemment, la protéine BAK1 est à la fois impliquée dans la transmission du signal de perception des MAMP et la perception des brassinostéroïdes (BR). Les BR sont des phytohormones impliquées dans la croissance de la plante (Robert-Seilanianz et al., 2011). Il a été mis en évidence qu'un traitement BR améliore la résistance du tabac et du riz aux agents pathogènes *P. syringae* pv. *tabaci* ou *M. oryzae* respectivement (Nakashita et al., 2003). Chez *A. thaliana*, il a été montré que les BR entraînent une accumulation de SA et l'expression du gène de défense *PR1*, indépendamment de la régulation par NPR1 (Divi et al., 2010).

○ *L'éthylène*

L'éthylène (ET) est une phytohormone impliquée notamment dans la mise en place de réponses lors d'une interaction entre une plante et un microorganisme pathogène, ou lors d'une réponse à un MAMP (Felix et al., 1999; Glazebrook, 2005). En présence d'ET, des facteurs de transcription tels que EIN3 et EIL1 (Ethylene-Insensitive 3 et Ethylene-Insensitive 3-Like 1) sont responsables de l'activation transcriptionnelle de gènes de réponse à l'ET (Chao et al., 1997). Parmi les gènes de réponse à l'ET se trouve le gène *ERF1* codant un facteur de transcription impliqué dans la mise en place des défenses de l'hôte en réponse aux pathogènes nécrotrophes (Berrocal-Lobo and Molina, 2004). Le gène *ERF1* intervient également dans la signalisation déclenchée par le JA en réponse à une infection pathogène (Figure I.24). L'activation transcriptionnelle par *ERF1* conduit notamment à la production de la défensine PDF1.2, qui est une protéine PR à activité antimicrobienne (Lorenzo et al., 2003). L'ET intervient également dans la réponse aux stress biotiques en inhibant la biosynthèse de SA.

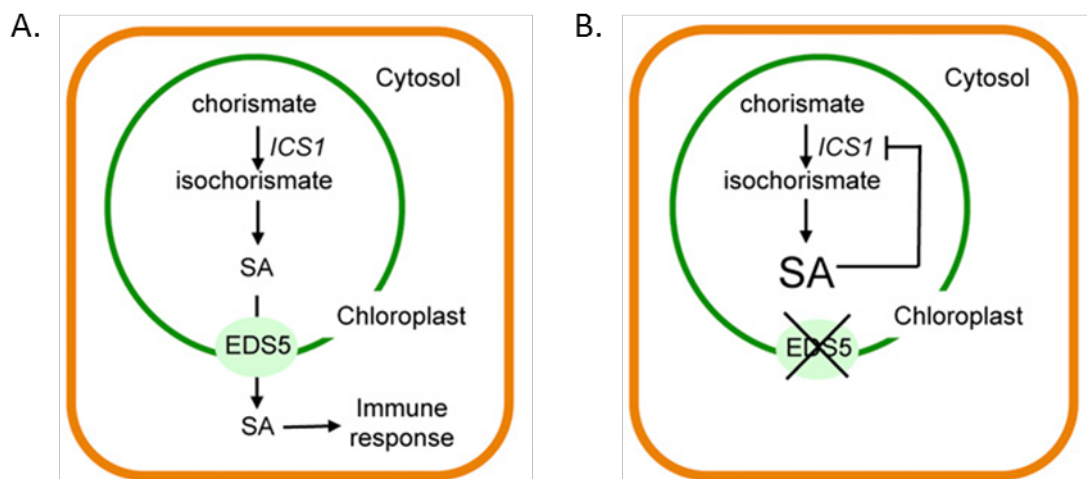


Figure I.26: Le modèle de la boucle de régulation de l'accumulation de l'acide salicylique chloroplastique.

- A. Dans le chloroplaste, l'enzyme isochorismate synthétase 1 (ICS1) catalyse la formation de l'isochorismate à partir du chorismate, ce qui permet la production de l'acide salicylique (SA). La protéine EDS5 permet l'export du SA produit vers le cytoplasme où il active la mise en place de réponses immunitaires.
- B. Chez le mutant *eds5*, le SA s'accumule dans le chloroplaste. Bien que le mécanisme ne soit pas caractérisé, cette accumulation pourrait générer une boucle de rétrocontrôle négatif sur la biosynthèse du SA.

Modifié d'après Serrano *et al.*, 2013

Effectivement, chez *A.thaliana*, EIN3 et EIL1 se fixent au promoteur de *ICS1*, un gène codant une enzyme de la voie de biosynthèse du SA et le répriment. (Chen et al., 2009). Parallèlement, les auteurs ont montré que les mutants *ein3/eil1* sont plus résistants à l'infection par *Pst* DC3000 que le génotype sauvage (Chen et al., 2009).

Le récepteur FLS2 d'*A. thaliana* est également régulé par l'ET (Boutrot et al., 2010). Sur les plantules du mutant de perception de l'ET *ein2*, l'expression du gène *FLS2* et l'accumulation de la protéine sont absentes, et d'autre part la transcription du gène *FLS2* est contrôlée par les facteurs de transcription de réponse à l'ET EIN3/EIL1/EIL2 qui se lient au promoteur de ce gène (Boutrot et al., 2010).

L'ensemble de ces études confirme l'existence d'une régulation des réponses immunitaires par l'éthylène, que ce soit au niveau de la perception des microorganismes ou niveau d'une régulation croisée avec le SA.

○ *L'acide salicylique ou salicylate*

Le SA est une phytohormone accumulée suite à une infection par un agent pathogène. Le SA active des défenses efficaces contre des pathogènes biotrophes (Glazebrook, 2005). Dans le chloroplaste, le SA est synthétisé par deux voies enzymatiques distinctes qui ont pour précurseur le même métabolite primaire, le chorismate, un intermédiaire de la voie des phénylpropanoïdes (Figure 1.25) (An and Mou, 2011). Ces deux voies de synthèse passent par la synthèse d'un intermédiaire qui est la phénylalanine ou l'isochorismate. La première étape de synthèse du SA *via* la phénylalanine est assurée par l'enzyme Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) qui génère l'acide cinnamique à partir de phénylalanine (An and Mou, 2011). Ensuite, l'acide cinnamique est hydroxylé en *O*-coumarate puis oxydé pour produire du SA, ou alors l'acide cinnamique est oxydé produisant un intermédiaire benzoïque puis hydroxylé en formant du SA (An and Mou, 2011). Chez le tabac, la production de SA est réalisée majoritairement à partir de phénylalanine et *via* un intermédiaire benzoïque (Yalpani et al., 1993). La biosynthèse de SA *via* l'isochorismate est assurée premièrement par la conversion du chorismate en isochorismate catalysée par l'isochorismate synthétase (ICS), puis par l'intervention de l'isochorismate pyruvate lyase (IPL) pour générer du SA (An and Mou, 2011). Chez *A. thaliana*, deux gènes codant des ICS chloroplastiques sont présents: les gènes *ICS1* (Isochorismate Synthase 1) (aussi nommé *SID2* (Salicylic acid Induction Deficient 2) ou *EDS16* (Enhanced Disease Susceptibility 16)) et *ICS2* (Wildermuth et al., 2001). En revanche, aucun gène codant d'enzyme IPL n'a été cloné chez les plantes (An and Mou, 2011). Pour éviter les effets cytotoxiques liés à une trop grande quantité de SA intracellulaire, une fois synthétisé celui-ci est converti en SA *O*- β -glucoside (SAG), ou en salicyloyl glucose ester (SGE), ou en méthyl salicylate (MeSA) ou encore en MeSA *O*- β -glucoside (MeSAG) (An and Mou, 2011).

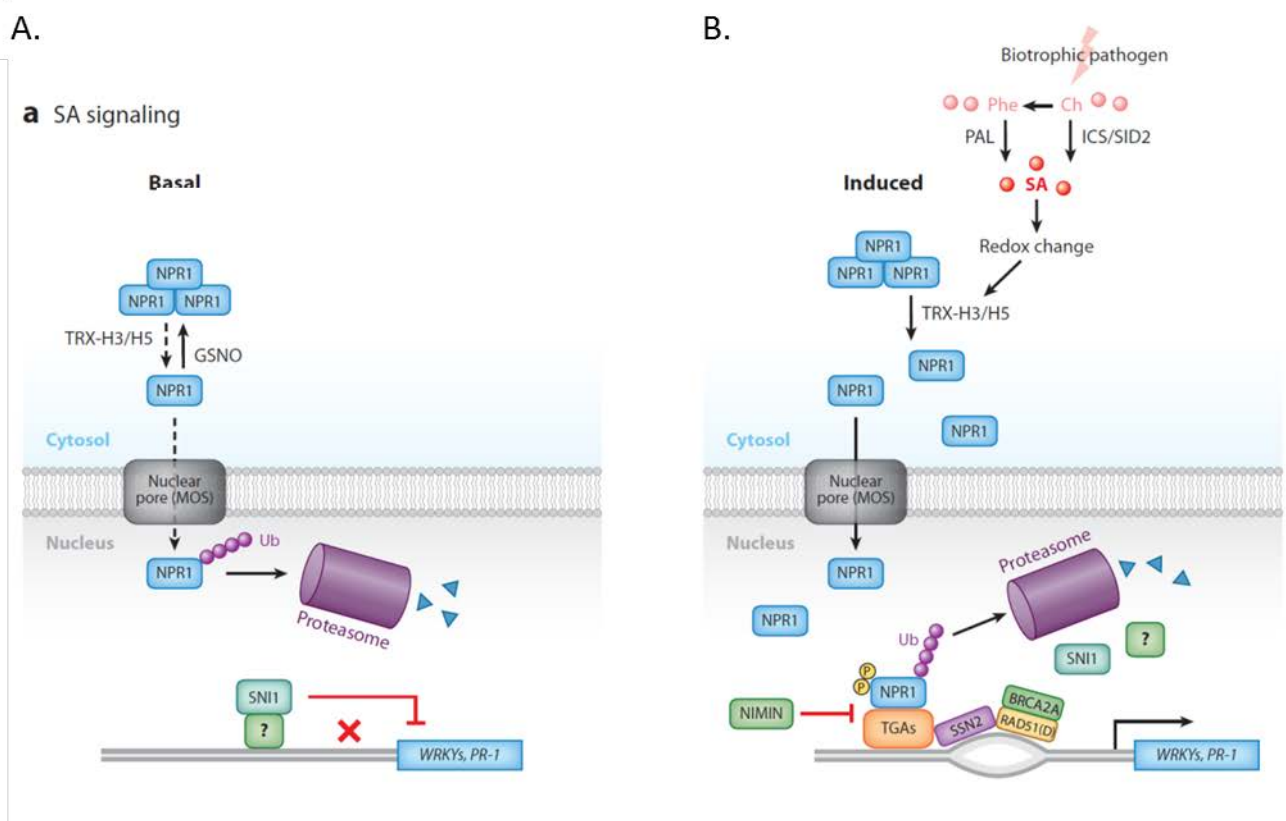


Figure I.27: Schéma de la signalisation de l'acide salicylique.

- A. En absence d'acide salicylique (SA), les protéines NPR1 (Non Expressor of PR genes 1) sont majoritairement dans le cytoplasme, sous forme d'oligomères *via* de S-nitrosylation dues à l'action de GSNO (S-Nitrosoglutathione). De ce fait, NPR1 ne peut pas entrer dans le noyau et lever la répression transcriptionnelle exercée sur les gènes de réponse au SA par SNI1 (Suppressor of *npr1* INDUCIBLE 1).
- B. Lors d'un stress biotique, le SA est synthétisé à partir du chorismate selon deux voies: la voie ICS1/SID2 (Isochorismate Synthétase 1) ou la voie PAL (Phénylalanine Ammonia Lyase) nécessitant une phénylalanine (Phe). L'accumulation de SA dans la cellule provoque un changement de l'état redox de la cellule et conduit à la monomérisation de NPR1 par les thioredoxines TRX-H3 et TRX-H5. Les monomères de NPR1 peuvent entrer dans le noyau par l'intermédiaire de protéines des pores nucléaires, telles que les protéines MOS (Modifier Of *snc1*). Dans le noyau, les monomères de NPR1 interagissent avec des facteurs de transcription TGA de type basic leucine zipper (bZIP) afin de se fixer sur les promoteurs des gènes de réponse au SA et activer leur expression, comme *PR-1*. Au cours de ce processus, NPR1 est phosphorylé (P) et ubiquitinylé (Ub), ce qui conduit à la dégradation de NPR1 par le protéasome. Pour une activation transcriptionnelle maximale des gènes de réponse au SA, cette dégradation est nécessaire et pourrait permettre le ré-initiation du cycle de transcription par d'autres monomères NPR1.

Pieterse *et al.*, 2012

EDS5 est une protéine homologue aux transporteurs de la famille MATE (Multidrug And Toxin Extrusion) nécessaire à l'accumulation de SA (Nawrath et al., 2002). La localisation cellulaire d'EDS5 est chloroplastique. L'expression du gène *EDS5* chez la levure a permis d'attribuer *in vivo* la fonction de transporteur du SA à la protéine EDS5 (Figure I.26). Étonnement, lors de l'étude de flux de SA radiomarké sur des chloroplastes isolés, à partir du mutant *eds5* ou de plantes contrôles, un défaut d'accumulation de SA a été observé chez *eds5* (Serrano et al., 2013). Les auteurs ont montré qu'en absence d'export du SA chloroplastique par EDS5, une trop forte accumulation de SA dans le chloroplaste provoque une inhibition de ICS1 permettant de limiter cette accumulation. Le lien mécanistique qui relie la protéine EDS5 et la régulation de la biosynthèse du SA n'est pas connu à ce jour.

Les voies de signalisation qui conduisent à l'accumulation de SA suite à la détection d'un agent microbien, un MAMP ou un effecteur, ont néanmoins un certain nombre d'éléments communs.

En effet, EDS1 et PAD4, Enhanced Disease Susceptibility 1 et Phytoalexin Deficient 4 respectivement, sont deux protéines formant un complexe requis pour l'induction de la synthèse de SA en réponse à un stress biotique (Wiermer et al., 2005). Le gène *PAD4* code une protéine prédite comme une triacyl-glycérol lipase qui agit en amont du SA et participe à l'amplification des réponses associées au SA (Zhou et al., 1998; Jirage et al., 1999). Le gène *EDS1* code une protéine homologue des lipases eucaryotes (Jirage et al., 1999; Wiermer et al., 2005). Lors d'une infection par *Pst* DC3000, Du et ses collaborateurs ont mis en évidence l'implication de la protéine SR1, également nommée CAMTA3 pour Ca^{2+} /calmoduline-binding Transcription factor, dans l'inhibition de l'accumulation de SA *via* la répression de l'expression de *EDS1* (Du et al., 2009). En effet, le mutant *sr1* s'est révélé être plus résistant à l'infection par *Pst* DC3000 que la plante sauvage. Cette résistance est corrélée à une expression de *PR1* plus précoce chez *sr1* et une plus forte accumulation de SA en réponse à *Pst* DC3000. Ces résultats, suggérant l'inhibition de la voie SA par SR1, ont été confirmés par les auteurs qui ont montré que SR1 réprime l'activation de la voie SA en se liant au promoteur de *EDS1* et en réprimant son l'expression (Du et al., 2009). Ces résultats indiquent que la régulation de la voie SA lors d'un stress biotique met en œuvre des mécanismes dépendants de la signalisation calcique.

Le SA active ensuite une voie de signalisation qui conduit à la production des protéines de défense PR. La protéine NPR1 (Nonexpressor of PR Genes 1) est un intermédiaire nécessaire à l'expression des gènes *PR1*, *PR2* et *PR5* chez *A. thaliana* (Figure I.27) (Cao et al., 1994; Cao et al., 1997). En présence de SA, les protéines NPR1 cytoplasmiques oligomérisées sont séparées en monomères sous l'effet du changement de statut redox du cytoplasme (Mou et al., 2003). Les monomères de NPR1 sont alors transportés vers le noyau où ils permettent l'activation de l'expression de gènes

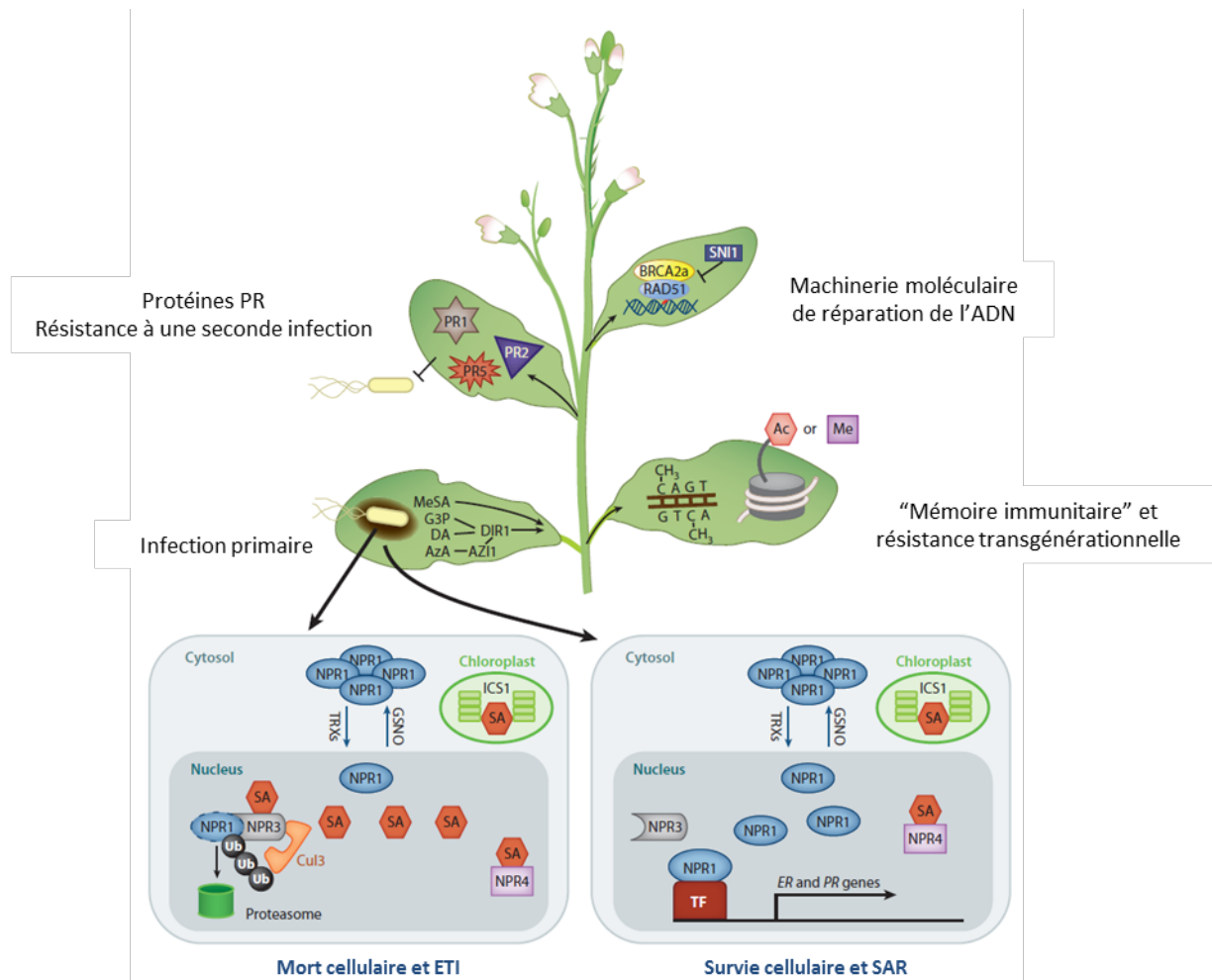


Figure I.28: Schéma de la signalisation de la résistance systémique acquise.

Une infection par un agent pathogène peut engendrer une immunité déclenchée par des effecteurs (ETI), qui est souvent associée à la mort cellulaire programmée (PCD) des cellules infectées, mais peut également produire l'hormone de défense acide salicylique (SA) dans les chloroplastes *via* une activité isochorismate synthétase 1 (ICS1). Des signaux mobiles sont aussi produits: l'acide azélaïque (AzA), le glycérol-3-phosphate (G3P), le méthylSA (MeSA) et le diterpénoïde deshydroabietinal abietane (DA). AzA régule l'expression du gène *AZI1*, qui coderait une protéine sécrétée de la famille des inhibiteurs de protéase/stockage dans la graine/transfert de lipides, et *DIR1*, une protéine putative de transfert des lipides, est nécessaire aux fonctions protéiques de AzA, G3P et DA. L'accumulation de SA affecte le statut redox de la cellule et la translocation de NPR1 *via* l'action de la S-nitrosoglutathione (GSNO) et l'action de thiorédoxines (TRXs). La concentration nucléaire de NPR1 est régulée par le niveau de SA cellulaire grâce aux protéines NPR3 et NPR4. La forte concentration de SA au site d'infection favorise l'interaction NPR1-NPR3 et la dégradation de NPR1 qui permet la PCD et l'ETI. Dans les cellules avoisinantes au site d'infection, un niveau moins élevé de SA rompt l'interaction NPR1-NPR4 ce qui conduit à l'accumulation de NPR1. NPR1 peut alors interagir avec des facteurs de transcription et activer l'expression des gènes *ER*, impliqués dans la sécrétion, et des gènes *PR* (Pathogenesis-Related) associés à la résistance contre une seconde infection, qui codent des protéines aux propriétés antimicrobiennes. L'éllicitation de la résistance systémique acquise (SAR) est associée à l'acétylation (Ac) des histones H3K9 et la méthylation (Me) des histones H3K4 des promoteurs de gènes qui contribuent à la SAR. De plus la méthylation de l'ADN et des protéines affecte l'architecture de la chromatine et la machinerie de réparation de l'ADN (SNI1, RAD51, BRCA2) qui pourraient alors être impliqués dans la mise en place de la SAR. Cette méthylation favorise la stabilité du génome de la génération suivante.

Modifié d'après Fu et Dong, 2013

nécessaires à l'établissement des défenses tels que le gène *PR1* ou des gènes codant des facteurs de transcription WRKY (Mou et al., 2003).

Le SA est également un composé important pour la coordination et la mise en place de la résistance systémique acquise (SAR) (Fu and Dong, 2013). En réponse à un MAMP, ou à une infection par un agent pathogène aboutissant à une HR ou une relation compatible, le phénomène de SAR est observé et confère à la plante une élévation généralisée de son niveau de défense pendant une longue période, de quelques semaines à plusieurs mois (Fu and Dong, 2013). Le mutant *ics1* qui synthétise très peu de SA, et la lignée surexprimant le gène bactérien NahG codant une SA hydroxylase responsable la dégradation du SA en catéchol, sont affectés dans la SAR (Gaffney et al., 1993). A l'inverse, une application exogène de SA conduit à l'établissement de la SAR (White, 1979).

Suite à une première infection, l'établissement de la SAR repose sur une signalisation rapide initiée au site d'infection et qui peut s'étendre à d'autres parties de la plante (Fu and Dong, 2013). Ceci suggère l'implication d'un signal mobile depuis le site d'infection, d'éléments de perception de ce signal dans l'ensemble des organes sains et l'instauration d'un arsenal immunitaire prêt à l'action (Figure 1.28).

Les signaux de la SAR ne sont pas formellement identifiés et plusieurs candidats ont été proposés selon les plantes étudiées (Fu and Dong, 2013). Le MeSA fait partie des signaux mobiles proposés comme vecteur de la mise en place de la SAR. Ce composé est formé à partir du SA sous l'action d'une méthyltransférase, et le MeSA peut ensuite être hydrolysé par des estérases pour redonner du SA (An and Mou, 2011). Au site d'infection, la forte concentration de SA inhibe l'action de l'enzyme MeSA estérase SABP2 chez le tabac ce qui entraîne l'augmentation localisée de la concentration de MeSA (Park et al., 2007b). Chez le tabac, l'extinction de l'expression du gène *SABP2* par stratégie ARNi génère des lignées de plantes affectées dans la SAR, indiquant que SABP est requise pour la SAR (Park et al., 2007b). Chez *A. thaliana*, le gène *BSMT1* code l'enzyme responsable de la méthylation du SA, c'est-à-dire qui catalyse la formation de MeSA à partir de SA (Chen et al., 2003). Contrairement à ce qui a pu être observé chez le tabac, le mutant *bsmt1* d'*A. thaliana* n'est pas affecté dans la mise en place de la SAR bien qu'il n'y ait pas de MeSA généré dans ces plantes (Attaran et al., 2009).

Le MeSA est donc nécessaire à l'établissement de la SAR chez le tabac, alors que chez la plante *Arabidopsis* cette molécule n'est pas indispensable. Cet exemple illustre la complexité de l'étude de la signalisation sous-jacente aux mécanismes de la SAR chez les plantes.

Comme cela a été mentionné précédemment, NPR1 est un senseur du SA et permet sa signalisation en aval. Selon la concentration en SA de la cellule, NPR1 est associé, ou non, avec les protéines NPR3

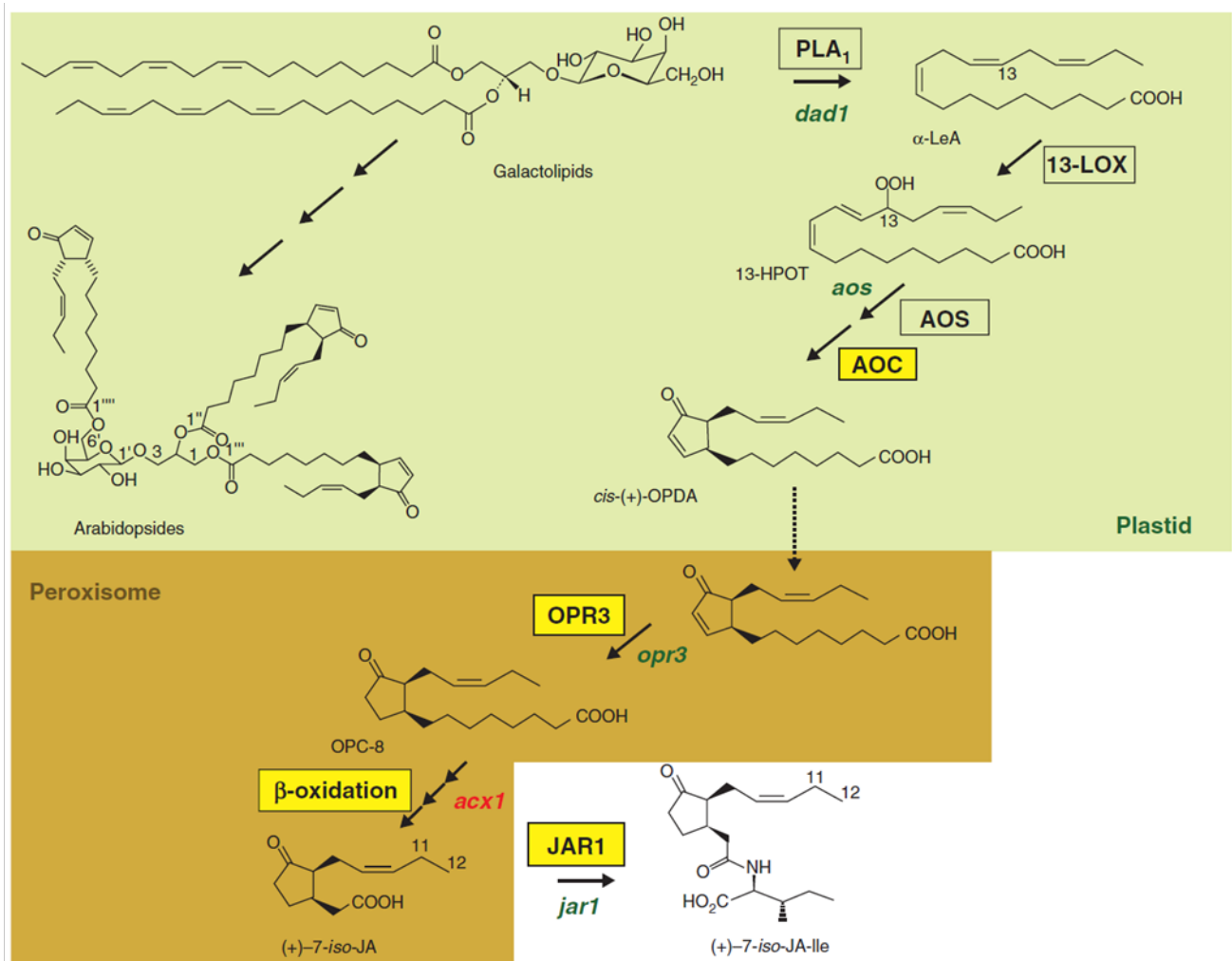


Figure I.29: La biosynthèse de l'acide jasmonique chez les plantes.

Le JA est un composé dérivé de l'acide α-linolénique (α-LA), un galactolipide issu de la dégradation des membranes du chloroplaste. La première étape dans la voie de biosynthèse du JA est l'oxydation du α-LA par une lipoxygénase (LOX), générant alors une oxylipine. Les enzymes allène oxyde synthétase et allène oxyde cyclase, AOS et AOC respectivement, assurent la production d'acide oxophytodiénoïque (OPDA) à partir de l'oxylipine formée. L'OPDA est alors réduit par l'enzyme OPR3, puis subit une β-oxydation pour former finalement du JA. Une fois le JA synthétisé, celui-ci peut être converti en méthyl-jasmonate (MeJA) sous l'action de l'enzyme JA carboxyl-méthyl transférase (JMT), ou conjugué à l'isoleucine par l'enzyme JAR1 sous une forme biologiquement active JA-Ile

Modifié d'après Wasternack et Hause, 2013

et NPR4 (Fu et al., 2012). Un modèle de régulation de NPR1 par NPR3 et NPR4 a été récemment décrit (Fu et al., 2012). NPR3 et NPR4, qui sont des senseurs du gradient de SA au site de l'ETI, contrôlent le niveau d'accumulation de NPR1 en provoquant son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome (Fu et al., 2012). Ainsi, en absence d'infection par un microorganisme pathogène, les protéines NPR1 et NPR4 sont associées, ce qui permet l'adressage constitutif de NPR1 au protéasome. NPR1 est alors dégradé et les cellules ne mettent pas en place de programme de défense (Fu et al., 2012). Lorsqu'une attaque par un agent pathogène se produit, la très forte concentration de SA induite au site d'infection favorise la liaison de NPR1 et NPR3; NPR1 est alors dégradé par le protéasome. L'absence de NPR1, associée à une forte quantité de SA, provoque une réponse immunitaire sous forme de mort cellulaire au site d'infection (Fu et al., 2012). Dans les cellules en périphérie du site d'infection, il y a une concentration de SA inférieure à celle du site d'infection qui est suffisante pour déstabiliser l'interaction entre NPR1 et NPR4, mais insuffisante pour permettre la liaison entre NPR1 et NPR3 (Fu et al., 2012). De ce fait, NPR1 est accumulé dans ces cellules ce qui permet la mise en place de réponses de défense, la survie des cellules et le déclenchement de la SAR (Fu et al., 2012).

La SAR assure une protection à large spectre de la plante contre différents types d'agents pathogènes, allant de quelques semaines à quelques mois, mais peut également être transmise en descendance. L'acétylation et la méthylation des histones modulent l'expression des gènes, et cette modulation peut être transgénérationnelle. Parmi ces gènes peuvent se trouver des gènes associées à la résistance des plantes contre les agents pathogènes et à la SAR (Fu and Dong, 2013). Dans la descendance de plantes d'*A. thaliana* infectées par *Pst* DC3000, en comparaison à la descendance de plantes saines, la résistance associée à la voie du SA est plus intense et plus rapidement induite suite à l'infection par *Pst* DC3000 ou *H. arabidopsidis* (Luna et al., 2012). Chez ces mêmes plantes, les promoteurs des gènes *PR1*, et des gènes *WRKY6* et *WRKY53*, qui codent des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation en aval du SA, sont enrichis en histones H3 acétylés et en marques associées à l'activation transcriptionnelle (Luna et al., 2012).

○ *L'acide jasmonique ou jasmonate*

Le JA est une phytohormone accumulée suite à une infection par un agent pathogène. Le JA active des défenses efficaces contre des pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Le JA est un composé dérivé de l'acide α -linoléinique (α -LA), un galactolipide issu de la dégradation des membranes du chloroplaste (Wasternack and Hause, 2013). La première étape dans la voie de biosynthèse du JA est l'oxydation du α -LA par une lipoxygénase (LOX), générant alors une oxylipine (Figure I.29) (Bannenberg et al., 2009). Les enzymes allène oxyde synthétase et allène oxyde cyclase, AOS et AOC respectivement, assurent la production d'acide oxophytodiénoïque (OPDA) à partir de

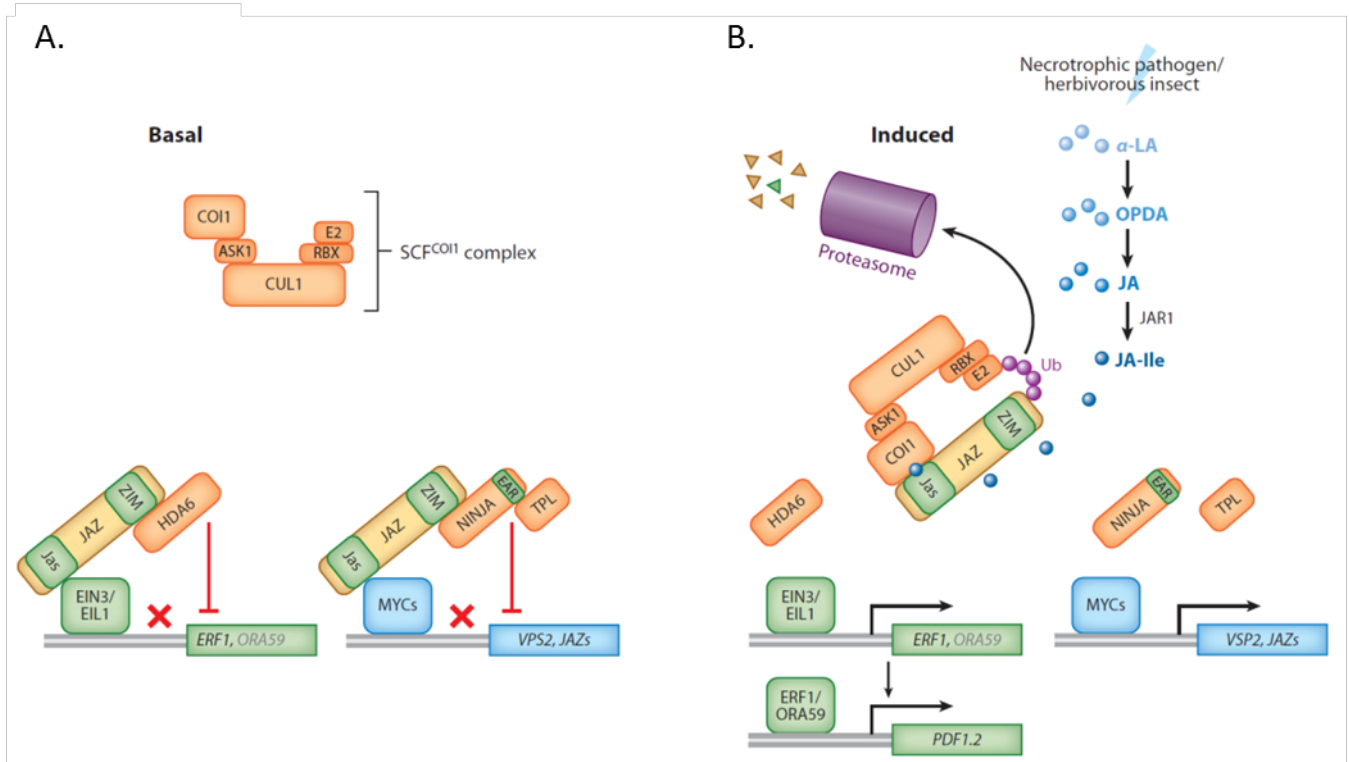


Figure I.30: Schéma de la signalisation de l'acide jasmonique.

- A. En absence de JA dans la cellule, la protéine JAZ (Jasmonate Zim) et ses partenaires protéiques HDA6, NINJA et TPL assurent la répression transcriptionnelle des gènes de réponse au JA, tels que *ERF1*, *PDF1.2*, *VPS2* et les gènes *JAZ*.
- B. En présence de JA-Ile, la protéine JAZ s'associe avec la protéine COI1 (Coronatine Insensitive 1), et cette association provoque l'ubiquitination de JAZ par COI1 et des protéines du complexe SCF^{COI1}, puis permet la dégradation de la protéine JAZ. De cette manière, en présence de JA-Ile, la répression transcriptionnelle exercée sur les gènes de réponse au JA est levée, permettant l'établissement de réponses de défense de la plante. Les facteurs de transcription EIN3/EIL2 et MYC sont responsables de l'activation transcriptionnelle des gènes de réponse au JA.

Pieterse *et al.*, 2012

l'oxylipine formée. L'OPDA est alors réduit par l'enzyme OPR3, puis subit une β -oxydation pour former finalement du JA (Wasternack and Hause, 2013). Une fois le JA synthétisé, celui-ci peut être converti en méthyl-jasmonate (MeJA) sous l'action de l'enzyme JA carboxyl-méthyl transférase (JMT), ou conjugué à l'isoleucine par l'enzyme JAR1 sous une forme biologiquement active JA-Ile (Seo et al., 2001; Staswick and Tiryaki, 2004). Les facteurs de transcription EIN3/EIL1 et MYC sont responsables de l'activation transcriptionnelle des gènes de réponse au JA (Figure I.30) (Pieterse et al., 2012). En absence de JA dans la cellule, la protéine JAZ (Jasmonate Zim) assure la répression transcriptionnelle des gènes de réponse au JA (Sheard et al., 2010). En présence de JA-Ile, la protéine JAZ s'associe avec la protéine COI1 (Coronatine Insensitive 1), et cette association provoque l'ubiquitination de JAZ par COI1 et des protéines du complexe SCF^{COI1}, puis permet la dégradation de la protéine JAZ (Sheard et al., 2010). De cette manière, en présence de JA-ILE, la répression transcriptionnelle exercée sur les gènes de réponse au JA est levée, permettant l'établissement de réponses de défense de la plante.

Les gènes de réponse au JA sont sous la dépendance de deux types d'activateurs, les facteurs de transcription MYC et EIN3/EIL1 (Pieterse et al., 2012). Chez *A. thaliana*, la voie de signalisation dépendante de la régulation ERF1, conduisant notamment à la production d'une défensine codée par le gène *PDF1.2*, est la plus généralement associée à la résistance contre les pathogènes nécrotrophes (Lorenzo et al., 2003). La signalisation dépendante du facteur de transcription MYC2, codé par le gène *JIN1* (Jasmonate-Insensitive 1), est plutôt associée aux réponses mises en place à la suite de blessures ou de défenses contre les insectes et herbivores chez *Arabidopsis* (Lorenzo et al., 2004). En effet, le mutant *jin1* est plus résistant à l'infection par les agents pathogènes nécrotrophes *P. cucumerina* et *B. cinerea*.

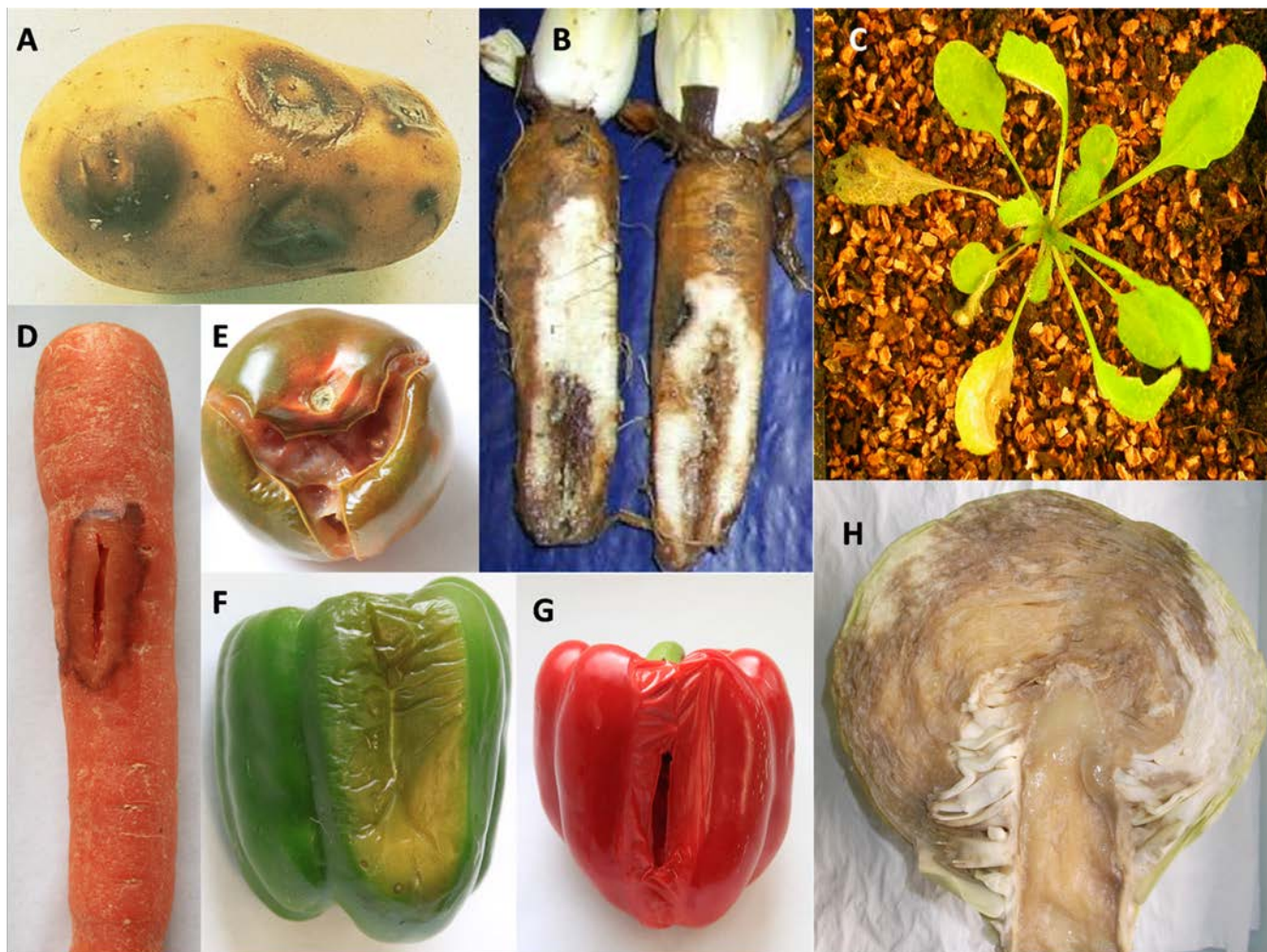


Figure I.31: Exemples de symptômes de pourriture molle causés par *D. dadantii* sur différentes plantes hôtes.

A. Symptômes sur un tubercule de pomme de terre. B. Symptômes sur des racines d'endive. C. Symptômes sur la rosette d'*Arabidopsis thaliana*. D. Symptômes sur une racine de carotte. E. Symptômes sur la tomate. F. Symptômes sur le poivron vert. G. Symptômes sur le poivron rouge. H. Symptômes sur le chou.

Reverchon et Nasser, 2013

4. L'interaction entre la bactérie pathogène *Dickeya dadantii* et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*

Après cette présentation générale des interactions entre les plantes et les microorganismes pathogènes, je vais présenter un pathosystème très étudié au laboratoire, le pathosystème *A. thaliana*-*D. dadantii* qui a été utilisé dans une partie de ma thèse et qui a été à l'origine du projet.

4.1. Présentation de *Dickeya dadantii*

Dickeya dadantii 3937 est une bactérie phytopathogène de la famille des entérobactéries, anciennement classée dans le genre *Erwinia* et dénommée *E. chrysanthemi* 3937 (Samson, 2005). Cette bactérie à Gram négatif provoque des maladies caractérisées par des symptômes de pourriture molle sur diverses espèces végétales d'importance économique, au champ et en conservation (Figure I.31). Par exemple, *D. dadantii* cause des dégâts sur les endives au moment du forçage et sur la plante ornementale *Saintpaulia ionantha* (ou violette africaine). Elle infecte également la plante modèle *A. thaliana*. *D. dadantii*, initialement isolée dans les régions tropicales, est aujourd'hui bien implantée en Europe (Toth et al., 2011). Cette bactérie apparaît au neuvième rang parmi les bactéries phytopathogènes les plus étudiées en laboratoire et les plus importantes économiquement, et la souche 3937 de *D. dadantii*, qui a été isolée depuis la plante hôte *S. ionantha*, est étudiée depuis plus de 25 ans (Diolez and Coleno, 1985; Mansfield et al., 2012). C'est d'ailleurs cette souche qui a été choisie par le consortium international pour le séquençage et l'annotation du génome de *D. dadantii* (Glasner et al., 2011; <http://asap.ahabs.wisc.edu/annotation/php/ASAP1.htm>).

4.1.2. Les facteurs du pouvoir pathogène de *D. dadantii*

4.1.2.1. Les déterminants moléculaires du pouvoir pathogène

4.1.2.1.1. Les pectinases sécrétées par *D. dadantii* lors de l'infection

Lorsque la bactérie est en contact avec le tissu végétal, celle-ci produit entre autres des fibrilles de cellulose, sécrète des exopolysaccharides et un biosurfactant lui permettant d'adhérer à la surface de

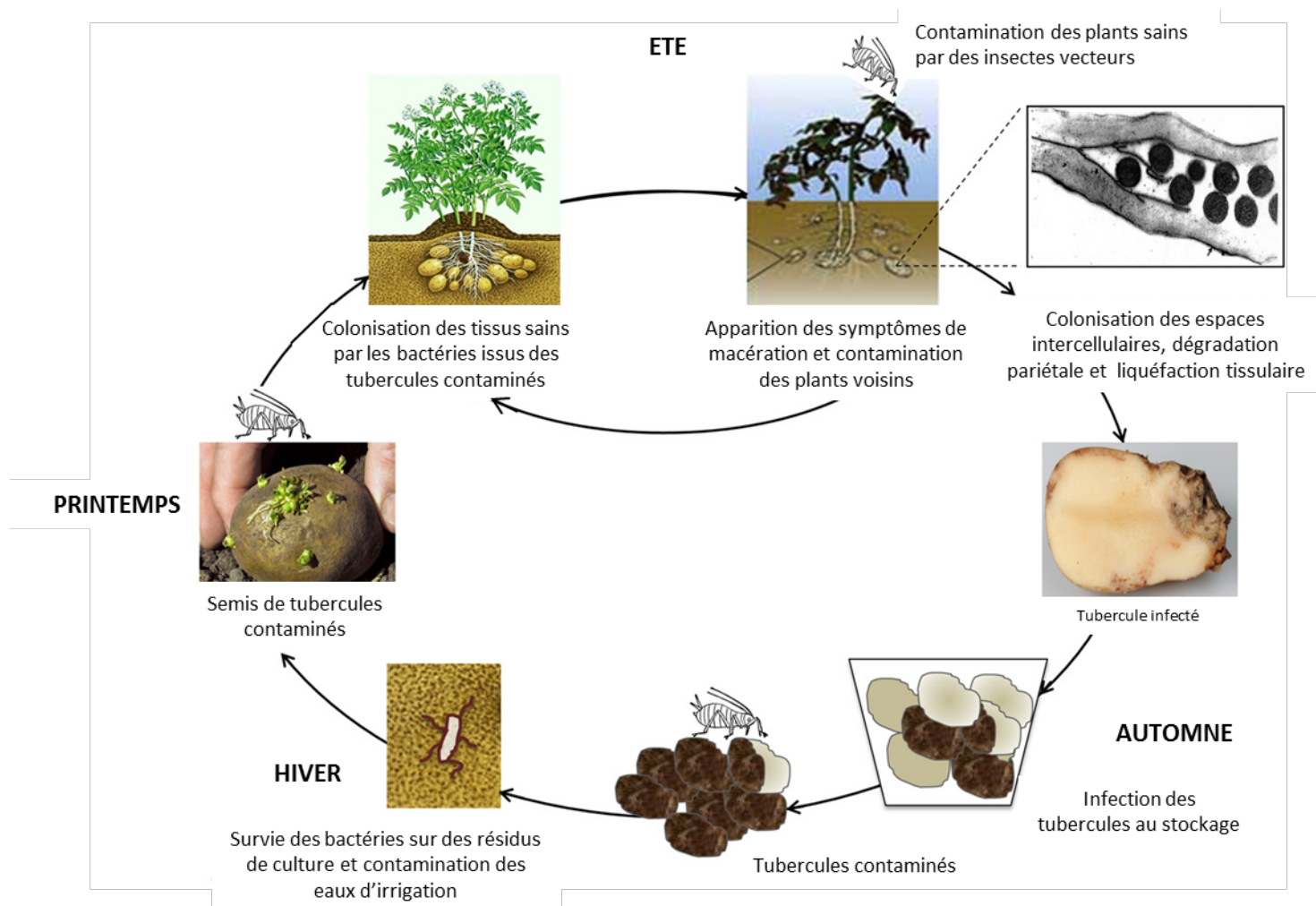


Figure I.32: Le cycle épidémiologique de *D. dadantii* sur la pomme de terre.

C'est au cours du printemps que, constitué à partir de bactéries ayant persisté dans le sol, l'inoculum primaire infecte les tubercules de pomme de terre. Puis, durant l'été, les bactéries des semences infectées envahissent les jeunes organes aériens et les racines, où les bactéries se développent dans les espaces intercellulaires causant les symptômes de pourriture molle. Cette population bactérienne peut atteindre les tubercules nouvellement formés, ou se maintenir dans l'eau du sol pendant l'hiver puis générer de nouvelles contaminations dès que les conditions redeviennent favorables. Ces nouvelles colonisations sont favorisées suite aux blessures provoquées pendant la récolte, de ce fait la maladie peut se déclarer une fois les tubercules en conservation. De plus, les insectes peuvent intervenir tout au long de ce cycle car ils provoquent des blessures sur les organes végétaux constituant ainsi des portes d'entrée pour les bactéries. Ils peuvent également être vecteurs d'infection en disséminant les bactéries d'une plante à l'autre.

Reverchon et Nasser, 2013

la plante et de pouvoir la coloniser (Condemine et al., 1999; Hommais et al., 2008; Jahn et al., 2011). Outre la présence d'un flagelle permettant à *D. dadantii* de se mouvoir et se propager, cette bactérie est attirée par l'acide jasmonique produit au niveau des blessures (Antunez-Lamas et al., 2009). La bactérie mène ainsi une vie de type "épiphyte" sur la plante et, lorsque les conditions environnementales lui sont favorables (une température douce (30°C), un degré d'humidité élevé et une faible pression partielle d'oxygène), une transition vers un mode de vie nécrotrophe s'opère et les bactéries pénètrent dans le tissu (Reverchon and Nasser, 2013). Une fois que les bactéries se trouvent dans l'apoplasme, qui est un compartiment acide, les bactéries initient un remodelage métabolique pour s'adapter aux contraintes environnementales (Figure I.32). Afin de limiter leur acidification, les bactéries réduisent les entrées de H^+ , en réduisant la production du moteur flagellaire ou en modifiant les décorations de la membrane pour la rendre moins perméable. Elles favorisent l'excrétion de proton *via* des antiports (Reverchon and Nasser, 2013). Parallèlement, la perception du microorganisme pathogène par la plante déclenche des réactions de défense qui ont pour conséquence une alcalinisation de l'apoplasme. *D. dadantii* sécrète des enzymes lui permettant de dégrader la paroi végétale dont certaines ont une activité optimale en milieu alcalin (Nachin and Barras, 2000).

Les pectinases et les cellulases de *D. dadantii* sont sécrétées par un système de sécrétion de type II appelé système « Out » et les protéases sont sécrétées par l'intermédiaire du système de sécrétion de type I, PrtDEF (Figure I.33) (Reverchon and Nasser, 2013). Les symptômes de macération causés majoritairement par les activités pectate lyases ne sont plus observés sur plante hôte lorsqu'un mutant *out* est inoculé. Les mutants affectés dans les gènes codant les pectinases sont peu virulents, démontrant ainsi l'importance de la sécrétion des enzymes de dégradation de la pectine pour l'intégrité du pouvoir pathogène de *D. dadantii*. En effet, les gènes *cel* qui codent les cellulases ne semblent pas nécessaires au pouvoir pathogène de la bactérie (Boccaro et al., 1994). Les gènes *prt* codent les protéases qui participent à la maturation d'une pectate lysase Pell une fois sécrétée, en clivant la partie N-terminale, ce qui a pour effet de favoriser la dégradation de la paroi végétale (Shevchik et al., 1998).

L'arsenal pectinolytique de *D. dadantii* permet à la bactérie de dégrader la pectine en plusieurs étapes (Kazemi-Pour et al., 2004). Tout d'abord, les pectines méthyl-estérases PemA et PemB assurent la déméthylation de la pectine (Tardy et al., 1997). Les pectines acétyl-estérases PaeX et PaeY assurent la dé-acétylation du polygalacturonate. Les quatre polygalacturonases PehV, PehW, PehX et PehN assurent le clivage en oligomères du polygalacturonate, appelé aussi pectate. Cette bactérie possède également neuf endopectate-lyases ayant des spécificités de substrat différentes, PelA à PelE (les cinq enzymes majeures), Pell, PelL, PelZ et PelN identifiée récemment (Tardy et al.,

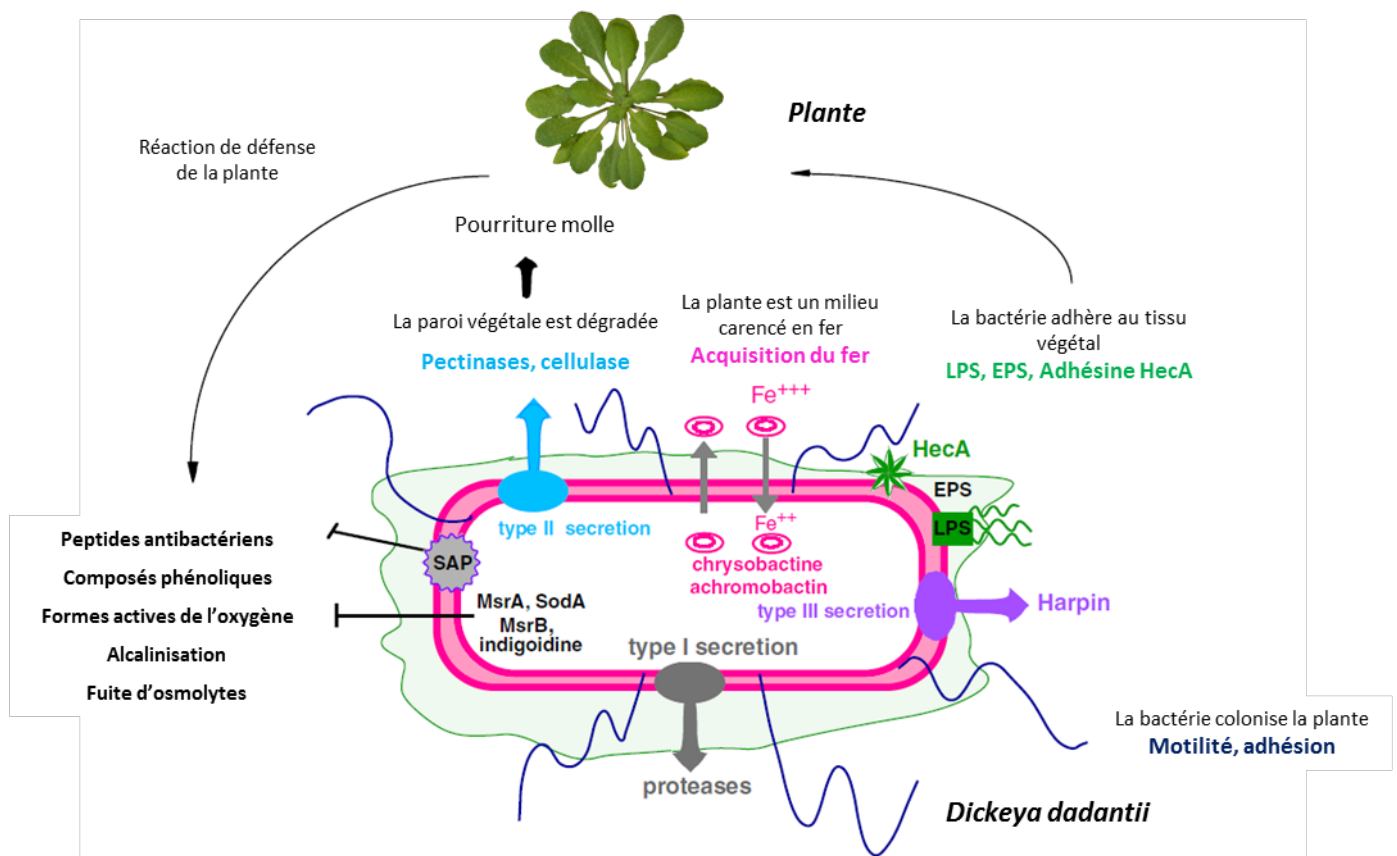


Figure I.33: Les déterminants du pouvoir pathogène de *D. dadantii*.

Abréviations: LPS: lipopolysaccharide; EPS: exopolysaccharide; SAP: Sensitive to Antimicrobial Peptide; Msr: Methionine sulfoxide reductase; SodA: Superoxyde dismutase A.

Sepulchre *et al.*, 2007

1997; Shevchik et al., 1998; Hassan et al., 2013; Reverchon and Nasser, 2013). Ces endopectate-lyases clivent les liaisons α 1,4-glycosidique des polygalacturonates, alors que les exopectates lyases PelW et PelX hydrolysent ces liaisons à partir des extrémités du polymère et génèrent des oligogalacturonides (Shevchik et al., 1999a; Shevchik et al., 1999b). Ces enzymes Pel sont classées dans quatre familles selon l'alignement des séquences protéiques, tel que PelA, B, C, D, E et Z appartiennent à la famille PL1, les familles PL2 et PL3 ne comprennent qu'une enzyme, PelW et PelI respectivement, et la famille PL9 est composée de PelL, X et N. Comme évoqué précédemment, l'activité de ces enzymes est dépendante du pH mais également de la présence d'un cofacteur cationique. La plupart des Pel ont le Ca^{2+} comme cofacteur, mais PelW et PelX assurent leur fonction catalytique en présence de Mn^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} (Tardy et al., 1997; Shevchik et al., 1999a; Shevchik et al., 1999b). Contrairement aux autres Pel, l'activité catalytique de PelN est maximale à un pH très faiblement alcalin de 7,4, et son cofacteur cationique est le Fe^{2+} (Hassan et al., 2013).

4.1.2.1.2. Le système de sécrétion de type III de *D. dadantii*

D. dadantii possède également un système de sécrétion de type III (SST3) qui lui permet de délivrer dans la cellule végétale les harpines HrpN et HrpW, ainsi que l'effecteur DspEF (Yap et al., 2005). L'expression des gènes codant le SST3 est induite en réponse à des composés phénoliques produits par la plante : l'acide o-coumarique (OCA), l'acide t-cinnamique (TCA) (Yang et al., 2008). Sur le tabac, une plante non-hôte, la bactérie ne provoque pas de macération mais une HR (Yang et al., 2002). Cette HR est dépendante du système *hrp* chez le tabac infecté par des souches mutantes de *D. dadantii* incapables de produire et sécréter des pectinases (Bauer et al., 1994). Le SST3 est nécessaire à la pathogénie de la bactérie lorsque l'appareil pectinolytique n'est plus opérationnel. Le SST3 n'a pas un rôle majeur dans le pouvoir pathogène de *D. dadantii*.

4.1.2.1.3. La protection contre les composés toxiques

L'intrusion microbienne est perçue par la plante, qui déploie alors un arsenal défensif afin de limiter la progression du microbe dans ses tissus. Parmi cet arsenal, la plante produit des peptides antimicrobiens et favorise la formation des espèces réactives de l'oxygène (Lopez-Solanilla et al., 1998; Santos et al., 2001; Fagard et al., 2007). *D. dadantii* gère ces agressions en synthétisant des protéines pour se protéger du stress oxydatif telles que les superoxydes (SOD) dismutases SodA et SodC, des catalases ou encore l'indigoïdine, un pigment bleu caractéristique de cette bactérie (Reverchon et al., 2002).

Les SOD sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'O_2^- en H_2O_2 . Le mutant *sodA*, de *D. dadantii* est plus sensible à un traitement par le paraquat (herbicide provoquant une accumulation d'ions superoxydes) que la souche sauvage de *D. dadantii*. Sur tubercule de pomme de terre,

l'agressivité du mutant *sodA* est similaire à celle de la souche 3937. En revanche, ce mutant est moins agressif sur *saintpaulia*. Cette diminution d'agressivité peut être restaurée suite à un ajout de SOD, de catalase ou d'un piègeur d'anion superoxyde (Santos et al., 2001).

Dans l'apoplasme, le fer est peu disponible pour la bactérie, or cette dernière en a besoin pour assurer ses besoins métaboliques, comme la synthèse et la sécrétion de sidérophore pour sa nutrition en fer, et pour mener correctement le processus infectieux (Franza and Expert, 2013). D'autres éléments du métabolisme du fer de la bactérie sont également impliqués dans son agressivité. Par exemple, les systèmes d'assemblage des centres fer-soufre [Fe-S], Suf et Isc sont nécessaires à la réussite de l'infection (Expert et al., 2008; Rincon-Enriquez et al., 2008). D'autre part, afin d'éviter les effets délétères causés par la présence de fer au sein de la bactérie, *D. dadantii* possède des protéines spécialisées dans le stockage du fer intracellulaire. Ces protéines sont les maxi-ferritines FtnA et Bfr, et la mini-ferritine Dps, qui contribuent également à la pathogénie de la bactérie (Boughammoura et al., 2007; Boughammoura et al., 2011).

4.2. L'arsenal défensif déployé par la plante infectée : le cas d'*A. thaliana*

Tout d'abord, *A. thaliana* répond en modifiant la composition des parois : une accumulation de glycoprotéines riches en hydroxy-proline (HRGP) et des dépôts de callose sont observés avant l'apparition des symptômes de macération. Ces observations reflètent les deux phases d'infection par *D. dadantii* : la phase asymptomatique pendant laquelle les bactéries sont dans l'apoplasme et maintiennent un niveau bas de multiplication cellulaire, puis une seconde phase durant laquelle la quantité de bactéries augmente et les symptômes apparaissent (Fagard et al., 2007).

Une des réponses de défense d'*A. thaliana* à l'infection par *D. dadantii* est la production de FAO dans les tissus encore intègres. Des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène ont été détectés dans les chloroplastes et les parois cellulaires. L'étude de mutants *rbohD* et *rbohF*, pour lesquels la production de FAO est limitée, ont permis de montrer que RbohD, et dans une moindre mesure RbohF, sont une source de ce stress oxydatif dans cette interaction.

Au cours de l'interaction, la plante active des voies de défense dépendantes de phytohormones: l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Fagard et al., 2007). En observant la sensibilité des mutants *sid2*, *jar1* et *ein2* vis à vis de l'infection par *D. dadantii*, affectés dans les voies de défenses dépendante de SA, JA et ET respectivement, il a été mis en évidence que seules les

hormones de défenses JA et ET permettent à la plante de limiter le succès de l'infection. Concernant la production de SA, il a été montré qu'elle est dépendante de la voie SID2/ICS1 et qu'elle n'est pas liée à la production d'un stress oxydatif généré par les NADPH oxydases D et F en réponse à la bactérie (Fagard et al., 2007).

L'analyse de l'accumulation de transcrits de gènes marqueurs de la voie SA, JA et ET a révélé que la sécrétion de pectinases participe à l'élicitation de ces trois voies hormonales suite à l'infection bactérienne.

5. Contexte scientifique et objectifs du travail de thèse

5.1. Contexte scientifique du travail de thèse

Dans l'objectif d'identifier des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse de la plante *A. thaliana* à l'infection par la bactérie phytopathogène *D. dadantii*, Dellagi et al. ont adopté une démarche sans *a priori* de cDNA-AFLP pour identifier des gènes dont l'expression est activée chez *A. thaliana* par *D. dadantii* (Dellagi et al., 2005). De cette façon, l'ADNc correspondant au gène *AtFER1*, codant une protéine de stockage du fer chloroplastique, a été trouvé plus abondamment dans les tissus infectés par *D. dadantii*. Afin de mieux comprendre la part de *AtFER1* lors de l'interaction, les auteurs se sont intéressés au mutant d'insertion *atfer1* et à l'incidence de la perte d'expression du gène *AtFER1* en réponse à *D. dadanti*. Le mutant *atfer1* s'est révélé être plus sensible à l'infection que la plante sauvage Col-0, suggérant qu'*AtFER1* participe à la résistance de base de la plante contre *D. dadantii*. Des cinétiques d'expression de *AtFER1* et d'accumulation de la protéine correspondante ont mis en évidence une augmentation biphasique du niveau de transcrits et de protéines à 30 min puis 24h après infection, confirmée ensuite par l'expression du gène rapporteur *uidA*, codant la glucuronidase, sous le contrôle du promoteur de *AtFER1*. La protéine AtFER1 est donc requise dans le processus de défense d'*A. thaliana* contre *D. dadantii*.

De précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré que les sidérophores chrysobactine (CB) et achromobactine sont nécessaires au pouvoir pathogène de la bactérie *D. dadantii* sur plante hôte (Enard et al., 1988; Franza et al., 2005). L'infection d'*A. thaliana* avec un mutant bactérien affecté dans la biosynthèse de deux sidérophores, ne provoque pas d'accumulation de transcrits *AtFER1*, suggérant que les sidérophores bactériens sont responsables de l'induction de l'expression de *AtFER1* lors de l'infection. L'infiltration foliaire des sidérophores CB et desferrioxamine (DFO) a permis de confirmer l'activation de l'expression du gène *AtFER1* d'*A. thaliana* en réponse à la chélation du fer par des sidérophores.

Suite à l'obtention de ces résultats au laboratoire, une attention particulière a été portée aux transporteurs vacuolaires des cations métalliques NRAMP3 et NRAMP4 homologues des protéines NRAMP des mammifères (Thomine et al., 2003). En effet, chez les mammifères, la protéine NRAMP1 est un élément clef de la résistance de l'hôte en réponse à l'infection bactérienne (Forbes and Gros, 2001). L'infection d'*A. thaliana* par les bactéries pathogènes *D. dadantii* et *Pst* DC300 provoquent une augmentation de la quantité de transcrits du gène *NRAMP3* au site de l'infection (Segond et al., 2009). En utilisant les simples mutants *nramp3* et *nramp4*, le double mutant *nramp3nramp4* ainsi

que des lignées complémentées et de surexpression de ces gènes, les auteurs ont montré que le gène *NRAMP3* principalement, et dans une moindre mesure le gène *NRAMP4*, contribuent à la défense d'*A. thaliana* contre *D. dadantii*. Chez le double mutant *nramp3 nramp4*, l'accumulation des transcrits *AtFER1* en réponse à l'infection par *D. dadantii* est affectée, ce qui indique que l'induction de l'expression de *AtFER1* est régulée positivement par *NRAMP3* et *NRAMP4*. Segond et al. ont également mis en évidence une contribution de *NRAMP3* et *NRAMP4* à l'amplification du stress oxydatif provoqué chez *A. thaliana* lors de l'infection par *D. dadantii*.

L'infection des feuilles d'*A. thaliana* par *D. dadantii* provoque l'induction de l'expression de *NRAMP3* dans les racines. De plus, les auteurs ont montré que l'infection provoque aussi l'expression des gènes *FRO2* et *IRT1* qui codent respectivement la réductase ferrique et le transporteur de fer chez la plante.

Conjointement, ces travaux montrent qu'en plus des réponses immunitaires, l'infection d'*A. thaliana* par *D. dadantii* provoque une réponse de type carence en fer. Afin de mieux déterminer la contribution des sidérophores dans la réponse à l'infection et l'induction des réponses de carence en fer, plusieurs expériences ont été menées sur des plantes traitées avec des sidérophores purs (Dellagi et al., 2009).

Tout d'abord, il a été montré que la CB et la DFO conduisent à l'accumulation des transcrits du gène *PR1* dans les feuilles d'*A. thaliana*. Une quantification de SA dans les feuilles par la CB confirme l'induction de la voie SA dans les plantes traitées par CB. En étudiant l'expression de gènes marqueurs des défenses liées à la voie SA chez les mutants *npr1*, *eds5*, *pad4* et *sid2*, les auteurs ont montré que l'induction de l'expression de *PR1* par la CB est dépendante de *NPR1*, *EDS5* et *SID2* et indépendante de *PAD4*. Le traitement des plantes avec les ferri-sidérophores Fe-CB et Fe-DFO ne permet pas cette induction des réponses dépendantes de la voie SA, suggérant que la capacité de chélation du fer par le sidérophore est nécessaire à l'induction de ces réponses. De manière intéressante, le traitement CB sur des plantes carencées en fer ne permet pas d'activer l'expression de *PR1* et l'accumulation de SA. Ces résultats indiquent que la présence de fer dans la plante est requise pour l'activation de la voie SA par les sidérophores.

En plus de l'activation de *PR1*, Dellagi et al. ont montré que l'application du traitement sidérophore au niveau des feuilles d'*A. thaliana* permet l'activation de la machinerie d'acquisition du fer au niveau des racines de la plante. En effet, le traitement CB conduit à une accumulation des transcrits *FRO2* et *IRT1*, ainsi que l'induction de l'activité réductase ferrique. Le traitement des feuilles avec la forme Fe-CB ne provoque pas l'activation de ces réponses de carence en fer. Ces résultats indiquent

que la chélation du fer dans les feuilles de la plante sous l'action d'un sidérophore active un signal systémique de carence en fer jusque dans les racines.

Toutes ces données ont révélé des interactions évidentes entre le métabolisme du fer chez la plante et l'immunité. Dans ma thèse j'ai contribué à éclaircir les mécanismes mis en jeu dans le cadre de ces interactions.

5.2. Objectifs du projet de thèse

L'objectif principal de mon travail de thèse est de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les sidérophores microbiens déclenchent à la fois des réponses de carence en fer et des réponses immunitaires chez *A. thaliana*.

Nous souhaitons connaître les processus physiologiques de la plante mis en place en réponse au sidérophore. Afin de réaliser une analyse globale sans *a priori*, nous avons eu recours à un transcriptome d'*A. thaliana* en réponse au traitement DFO. Ainsi, deux fonctions principales ont été mises en évidence: la défense et l'homéostasie du fer. Le Chapitre II présente les résultats de cette analyse ainsi qu'une caractérisation des réponses mises en place, telles que la quantification d'hormones de défense ou un dosage des métaux dans la plante.

D'autre part, les résultats du transcriptome nous ont permis d'identifier un gène candidat potentiellement impliqué dans l'interaction entre le métabolisme du fer et l'immunité. Nous nous sommes focalisés sur un gène impliqué dans la signalisation, le gène *MPK11*. La caractérisation du mutant *mpk11* et la complémentation fonctionnelle seront traitées au Chapitre III.

Au cours de l'infection d'*A. thaliana* par *D. dadantii*, nous nous sommes intéressés à la répartition du fer à l'échelle tissulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode Perls'-DAB-H₂O₂ de coloration spécifique du fer (Chapitre IV).

Nous avons également étudié l'effet du statut en fer de la plante sur le développement de la maladie. Le Chapitre V présente les résultats d'une comparaison de l'agressivité de microorganismes pathogènes et du niveau de défense des plantes lorsque celles-ci sont en situation de carence en fer ou non.

L'ensemble des résultats obtenus est discuté dans la partie "Discussion générale et Perspectives" et dans un projet de revue sur le rôle des sidérophores dans l'élicitation des défenses chez les animaux et les végétaux (Chapitre VI).

RESULTATS

CHAPITRE II

**LES SIDEROPHORES MICROBIENS DECLENCENT
DES REPONSES DE DEFENSE ET PERTURBENT LE
METABOLISME DU FER CHEZ *A. THALIANA***

CHAPITRE II : LES SIDEROPHORES MICROBIENS DECLENCHENT DES REPONSES DE DEFENSE ET PERTURBENT LE METABOLISME DU FER CHEZ *A. THALIANA*

Préambule

Afin d'identifier les processus physiologiques mis en place par *A. thaliana* lors d'un traitement sidérophore, une approche sans *a priori* d'analyse transcriptomique avait été entreprise avant mon arrivée au laboratoire. Dans ce chapitre, l'analyse et la validation des données issues de ce transcriptome sont présentées. J'ai caractérisé les réponses de défenses de la plante en se basant sur l'évaluation des niveaux d'expression de gènes de défense, de l'observation de dépôt de callose et d'induction du stress oxydatif. Les niveaux d'hormones ont également été quantifiés. Je me suis également intéressé à la perturbation du métabolisme du fer engendré par le traitement sidérophore en évaluant les niveaux d'expression de gènes marqueurs de la carence en fer, la quantité de métaux dans la plante et la répartition cellulaire du fer. Enfin, j'ai étudié les réponses immunitaires chez *irt1*, un mutant affecté dans l'acquisition des métaux, et particulièrement du fer.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Ludivine Soubigou-Taconnat et Jean-Pierre Renou qui ont réalisé le transcriptome, en collaboration avec Gregory Mouille², Stéphanie Boutet qui ont mis au point et réalisé les dosages d'hormones, en collaboration avec Nassima Riache³, Delphine Joseph³, Didier Desmaële qui ont réalisé la synthèse de chrysobactine, et en collaboration avec Sébastien Thomine pour les dosages de métaux. Ces résultats sont présentés sous la forme de l'article "Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores", publié dans le journal "Plant physiology".

Title of the manuscript: Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores

Authors:

Aude Aznar^{1, 2}, Nicolas W. G. Chen^{1,5}, Martine Rigault^{1, 2}, Nassima Riache³, Delphine Joseph³, Didier Desmaële⁴, Gregory Mouille², Stéphanie Boutet², Ludivine Soubigou-Taconnat⁵, Jean-Pierre Renou^{5, †}, Sébastien Thomine⁶, Dominique Expert¹, Alia Dellagi^{1, 2,*}

Corresponding author: Alia Dellagi

Address:

¹ UMR217 INRA-AgroParisTech-UPMC Laboratoire Interactions Plantes-Pathogènes, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris cedex 05, France

² UMR1318 INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr (RD 10), F-78026 Versailles Cedex France

³ Université Paris Sud, UMR CNRS 8076 BioCIS, 5 Rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

⁴ Université Paris Sud, Institut Galien, UMR CNRS 8612, 5 Rue J. B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

⁵ URGV UMR1195, INRA-CNRS, UEVE, 91057 Evry, France,

⁶ Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Gif-sur-Yvette 91198, France

Phone: +33 1 30 83 32 40

E-mail: dellagi@agroparistech.fr

Abstract

Siderophores are specific ferric iron chelators synthesized by virtually all micro-organisms in response to iron deficiency. We have previously shown that they promote infection by the phytopathogenic enterobacteria *Dickeya dadantii* and *Erwinia amylovora*. Siderophores have also the ability to activate plant immunity. We have used CATMA microarrays to investigate the global transcriptional modifications in roots and leaves of Arabidopsis plants following leaf treatment with the siderophore deferrioxamine (DFO). Physiological relevance of these transcriptional modifications was validated experimentally. Immunity and heavy metal homeostasis appeared as the major processes affected by DFO. These two physiological responses could be activated by a synthetic iron chelator EDDHA indicating that siderophores eliciting activities rely on their strong iron chelating capacity. DFO was able to protect Arabidopsis against the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. Siderophore treatment caused local modifications of iron distribution in leaf cells visible by Perls'-DAB-H₂O₂ staining. Metal quantifications showed that DFO causes a transient iron and zinc uptake at the root level presumably mediated by the metal transporter IRT1. Defense gene expression and callose deposition in response to DFO were compromised in an *irt1* mutant. Consistently, plant susceptibility to *Dickeya dadantii* was increased in the *irt1* mutant. Our work shows that iron scavenging is a new mechanism of immunity activation in plants. It highlights the strong relationship between heavy metal homeostasis and immunity.

Introduction

As sessile organisms, plants have to cope with diverse microbial invaders and develop efficient strategies to survive potentially infectious attacks. Fortunately, pathogenic organisms often fail in infecting plants, and disease is more the exception than the rule. Apart from preformed physical and chemical barriers, plants are able to detect pathogen attack and activate complex signaling networks leading to induced defenses that confer a more tolerant state. Induced innate immune processes include phosphorylation events, accumulation of reactive oxygen species (ROS), cell wall rigidification, callose deposition, defense hormone signaling and PR-encoding gene expression (Nurnberger et al., 2004).

To activate such defenses against potential microbial pathogens, plants are equipped with sentry systems involving proteins devoted to the direct or indirect recognition of pathogen-derived elicitors. Recognition of conserved motifs in microbial molecules called Microbe Associated Molecular Patterns (MAMPs) requires Pattern Recognition Receptors (PRR) anchored to the plant cell plasma membrane. Plants are also equipped with complex recognition systems involving resistance proteins which allow recognition of proteins secreted by pathogens, known as effectors, with reference to the fact that these proteins are dedicated to promote infection (Nurnberger et al., 2004; Jones and Dangl, 2006).

Iron is essential for nearly all forms of life because it is required for the catalytic activity of proteins involved in essential cellular metabolic processes such as respiration, photosynthesis, DNA synthesis and defense against ROS. In aerobic conditions and under physiological conditions, iron is present as insoluble ferric (Fe^{III}) hydroxide complexes making it poorly available (about 10^{-17} M) for living organisms. Under reductive conditions, iron is in its ferrous form (Fe^{II}) and is more soluble. However Fe^{2+} can catalyze the Fenton reaction in the presence of hydrogen peroxide, thus leading to the formation of hydroxyl radicals resulting in protein damage, DNA breaks and lipid peroxidation (Pierre and Fontecave, 1999). Therefore organisms have to tightly control iron acquisition, utilization and storage at the cell as well as at the tissue levels.

In plants, iron is assimilated from the soil through the roots (Briat et al., 2007; Kim and Guerinot, 2007). Under conditions of iron deficiency, *Arabidopsis thaliana* activates a reductive mechanism described as Strategy I, based on the acidification of the soil by the action of H^+ -ATPases followed by iron reduction by the ferric chelate reductase FRO2, (Robinson et al., 1999), and finally transport of Fe^{2+} across the plasma membrane of root epidermal cells via the iron transporter IRT1 (Eide et al., 1996). Storage and buffering in dedicated compartments including the apoplast and organelles

(vacuole, plastids) allow protection against iron toxicity (Briat et al., 2007). In Arabidopsis, the ferritins AtFER1 to 4 are mainly involved in buffering iron and protecting the plant cells against oxidative stress (Ravet et al., 2009). FIT is a key iron deficiency responsive transcription factor since it regulates the expression of *FRO2* and *IRT1* presumably in concert with bHLH38 and bHLH39 (Colangelo and Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2008). The transcription factors PYE, bHLH100 and bHLH101 were recently identified as regulators of iron-deficiency responses in Arabidopsis (Long et al., 2010; Sivitz et al., 2012)

For iron acquisition, most microbes use selective ferric ion chelators called siderophores. Siderophores are low molecular weight molecules synthesized and secreted in response to iron deficiency (Andrews et al., 2003; Winkelmann, 2007). They have a high affinity for Fe^{3+} and display diversified chemical structures containing one, or a combination of, iron-binding moieties: hydroxamate, catecholate and hydroxyl-carboxylate. Once loaded with iron, siderophores are transported through the microbial envelope via specific transporters. Inside the microbial cell, iron is reduced, losing its affinity for the siderophore, and Fe^{2+} ions are then distributed to iron-containing molecules or stored in ferritins. In the soil, microbial siderophores can exert a beneficial effect on plant growth because they significantly increase the solubility of iron (Lemanceau et al., 2009). In addition, a crop protective effect of beneficial soil borne bacteria was often associated with the competition for iron with pathogenic species via siderophores (Bakker et al., 2007). Conversely, some plant pathogens use siderophores to acquire iron in the host and to promote infection (Expert, 1999; Haas et al., 2008).

Interestingly, several studies have shown that microbial siderophores can trigger defense responses. A well-known example of siderophore-mediated activation of plant defenses is the Induced Systemic Resistance (ISR) triggered by beneficial soil borne microbes which can be mediated by siderophores as well as by other microbial molecules such as antibiotics or MAMPs (De Vleeschauwer and Hofte, 2009). Secretion of siderophores by saprophytic *Pseudomonas* species in the rhizosphere can confer to the neighboring plants a protection against aerial pathogens and soil pathogens (Bakker et al., 2007). However, the molecular mechanism underlying the elicitor activity of these molecules remains unknown.

The siderophore chrysobactin (CB) produced by the pathogenic enterobacterium *Dickeya dadantii* promotes systemic plant colonization (Dellagi et al., 2005; Dellagi et al., 2009). Arabidopsis leaf infiltration with CB causes activation of iron deficiency responses and of the salicylic acid (SA) defense pathway which can repress the jasmonic acid (JA) defense pathway required for the plant defense against *D. dadantii* (Dellagi et al., 2009). In addition, CB provokes up-regulation of the iron

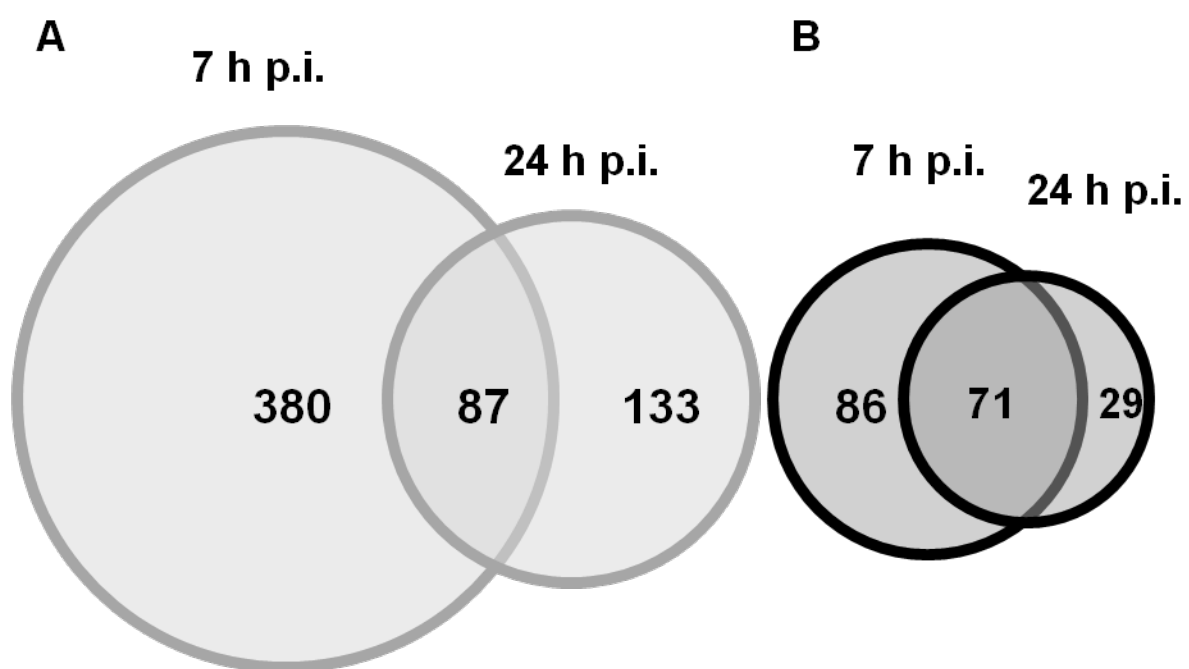


Figure 1 : Venn diagrams illustrating the transcriptome changes DFO vs. H₂O. Comparison of DFO-up (A) and DFO-down (B) genes in leaves at indicated times after treatment.

storage gene *AtFER1* which is involved in defense against *D. dadantii* (Dellagi et al., 2005). Neither activation of iron homeostasis gene expression nor activation of the SA pathway occur when siderophores are loaded with iron prior to leaf treatment. Therefore, iron homeostasis genes and immunity activation appear to rely on the siderophore's iron scavenging activity. Importantly, activation of the SA pathway by CB required the presence of a physiological amount of iron in the plant since iron starved plants failed to activate *PR1* gene expression and SA accumulation (Dellagi et al., 2009) .

Activation of the SA defense pathway by siderophores raises the question of whether this phenomenon is a major or a minor effect. To address this question we investigated the physiological processes triggered by the siderophore DFO with no a priori assumption, using a transcriptome analysis. We could expect that iron homeostasis would be the most important process modulated by this highly specific iron chelator, and that immunity would be a minor response. Surprisingly, our data show that plant immunity is the most important physiological process activated by the DFO in leaves. In roots, the major process being activated is heavy metal homeostasis. Physiological relevance of these results was validated experimentally. Our data reveal that strong iron scavengers trigger immunity via perturbation of heavy metal homeostasis.

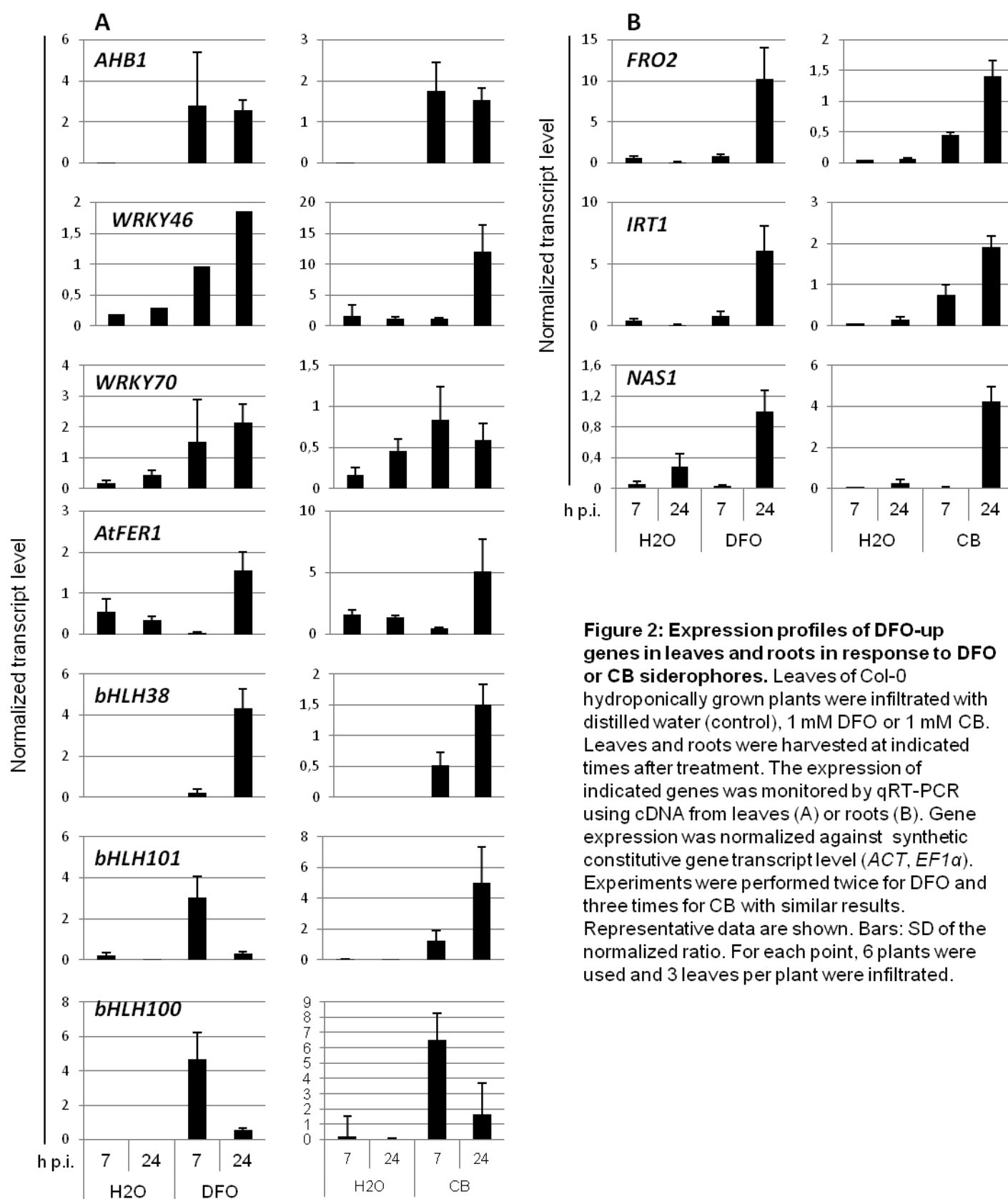


Figure 2: Expression profiles of DFO-up genes in leaves and roots in response to DFO or CB siderophores. Leaves of Col-0 hydroponically grown plants were infiltrated with distilled water (control), 1 mM DFO or 1 mM CB. Leaves and roots were harvested at indicated times after treatment. The expression of indicated genes was monitored by qRT-PCR using cDNA from leaves (A) or roots (B). Gene expression was normalized against synthetic constitutive gene transcript level (*ACT*, *EF1 α*). Experiments were performed twice for DFO and three times for CB with similar results. Representative data are shown. Bars: SD of the normalized ratio. For each point, 6 plants were used and 3 leaves per plant were infiltrated.

Results

Genome-wide analysis of leaf and root genes differentially expressed in response to siderophore treatment.

To gain an insight into the physiological changes caused by siderophores in Arabidopsis, CATMA microarrays were used to identify leaf and root genes that were differentially expressed following infiltration of the siderophore DFO in leaves. Using our well controlled hydroponic growth system, we performed a transcriptome analysis using the CATMA array V5 (see experimental procedures). The concentration of siderophore was adjusted to 1 mM as it was previously shown that lower concentrations provoked similar defense response activation but with a weaker intensity (see more details in discussion) (Dellagi et al., 2009). Comparisons consisted of water versus DFO treatment at each time point. Amongst the significantly differentially-expressed genes (Bonferroni p -value<0.05, see experimental procedures) only the genes with a two-fold difference at least were considered for further analyses, either up-regulated (DFO-up) or down regulated (DFO-down). In leaves, 7 hours following DFO treatment, 467 genes were up-regulated and 157 were down-regulated compared to the water control, while 24 hours after treatment, 220 genes were up-regulated and 100 were down-regulated (Fig. 1, Table S1). These data indicate that the transcriptional modifications caused by DFO treatment were greater at the early time point 7 hours post infiltration (h p.i.) than at later time point (24 h p.i.). The data in roots are different in that we found only one DFO-down gene at the early time point 7 h p.i. Twenty four hours p.i., 26 genes were up-regulated and one was down-regulated in roots. Thus, a longer delay was required before the occurrence of transcriptional changes in roots than in leaves in response to DFO infiltration. Certain genes showed inversed regulation at the two time points. As an example, the expression of *AtFER1* (At5g01600) in DFO treated leaves, is rapidly repressed 7 h p.i. then up-regulated 24 h p.i.(as confirmed by qRT-PCR Fig. 2).

Functional categories of genes differentially expressed in response to siderophore treatment in Arabidopsis

To gain further insight into the physiological processes that are affected by siderophores in Arabidopsis, we investigated the main functional categories the differentially expressed genes belong to. Data sets were analyzed with the tool provided at <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj.funcatDB/> (Ruepp et al., 2004). This allowed us to find most significantly

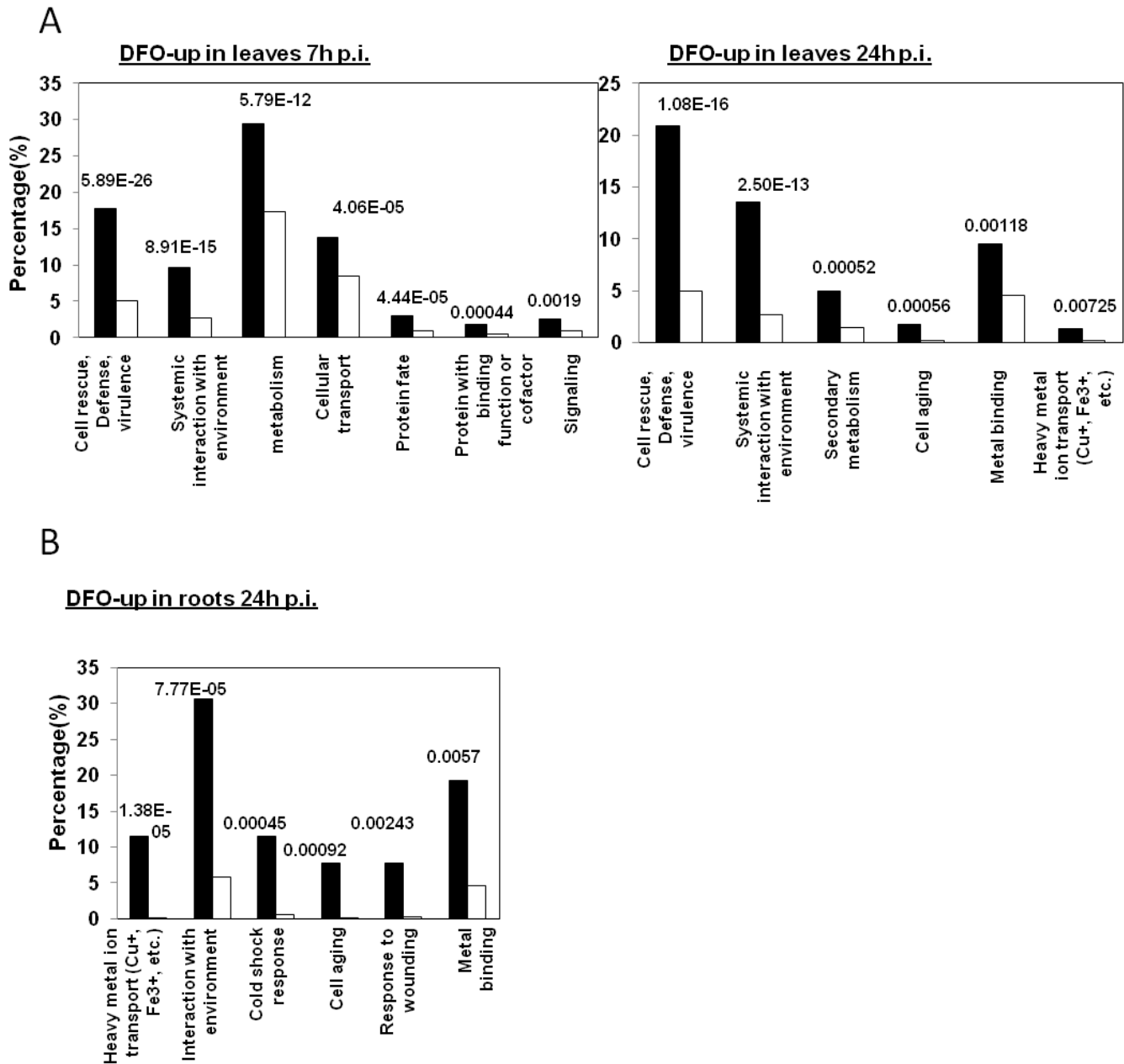


Figure 3: Over represented functional categories in up regulated genes. (A) In leaves 7 h p.i. and 24 h p.i. (B) In roots 24 h p.i. Data analysis was performed at Funcat (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>). White bars indicate percentage of category in the genome and black bars indicate percentage of category in our data set. P-values are indicated for each category.

over-represented categories compared to their representation in the Arabidopsis genome (Fig. 3). In leaves, the over-represented categories in the DFO-up genes 7 h p.i. are related to biotic and abiotic stress responses, including oxidative stress response and immune responses. An important number of genes involved in signaling functions were found to be up-regulated. For instance, 11 genes coding WRKY transcription factors were up-regulated at 7 h p.i. and/or 24 h p.i. (Table S2). This family of transcription factors is known to be involved in plant adaptation to the environment (Rushton et al., 2010). In addition, several genes coding kinases belonging to the MAP kinase or receptor kinase families were up-regulated (Table S3). Interestingly, most of these genes are up-regulated only at 7 h p.i., but not differentially expressed at 24 h p.i. This observation suggests that rapid and transient stress signaling reactions are triggered at early time points following siderophore treatment. A number of genes coding well known regulators of the iron deficiency response were found in DFO-up genes in the leaves at 7 h p.i.: *bHLH38* (Yuan et al., 2008; Sivitz et al., 2012), *bHLH100*, *bHLH101* (Sivitz et al., 2012), *BTS*, *PYE* (Long et al., 2010). Functional categories involved in the response to stress are also over-represented in the genes up-regulated at 24 h p.i. It is of interest to note that genes involved in handling of metals are significantly over-represented at this time point. The latter category includes a number of zinc finger proteins as well as the *AtFER1* gene.

The most significantly over-represented DFO-down genes in leaves at 7 h p.i. and 24 h p.i., fall into the functional category of light reactions and photosynthesis, biotic stress responses and lipid transport (Fig. S1). Lipid/fatty acid transport proteins are involved in endomembrane biosynthesis - in particular thylakoid membrane synthesis - and influence plastid integrity (Benning, 2009) . Thus, down regulation of the photosynthetic genes and lipid transfer proteins can be linked.

Interestingly, in roots, the most over represented functional category of DFO-up genes is heavy metal transport and interaction with the environment (Fig. 3). Taken together, these data indicate that the siderophore is likely to cause modifications in metal distribution in Arabidopsis leaves as well as in roots.

We analysed our data with the Genevestigator tool “SIGNATURE” (<https://www.genevestigator.com/gv/doc/signature.jsp>). The 100 most up-regulated genes and 100 most down-regulated genes in leaves 7 h p.i. were compared to the Genevestigator “perturbation” database using this tool. The experiments displaying most significant similarity to our DFO experiment include data from biotic stress-related studies (mainly oxidative stress-related, SA-related and pathogen infections experiments) as well as iron deficiency (Fig. S2). Taken together, these data indicate an intricate relationship between the plant immunity and iron deficiency pathways.

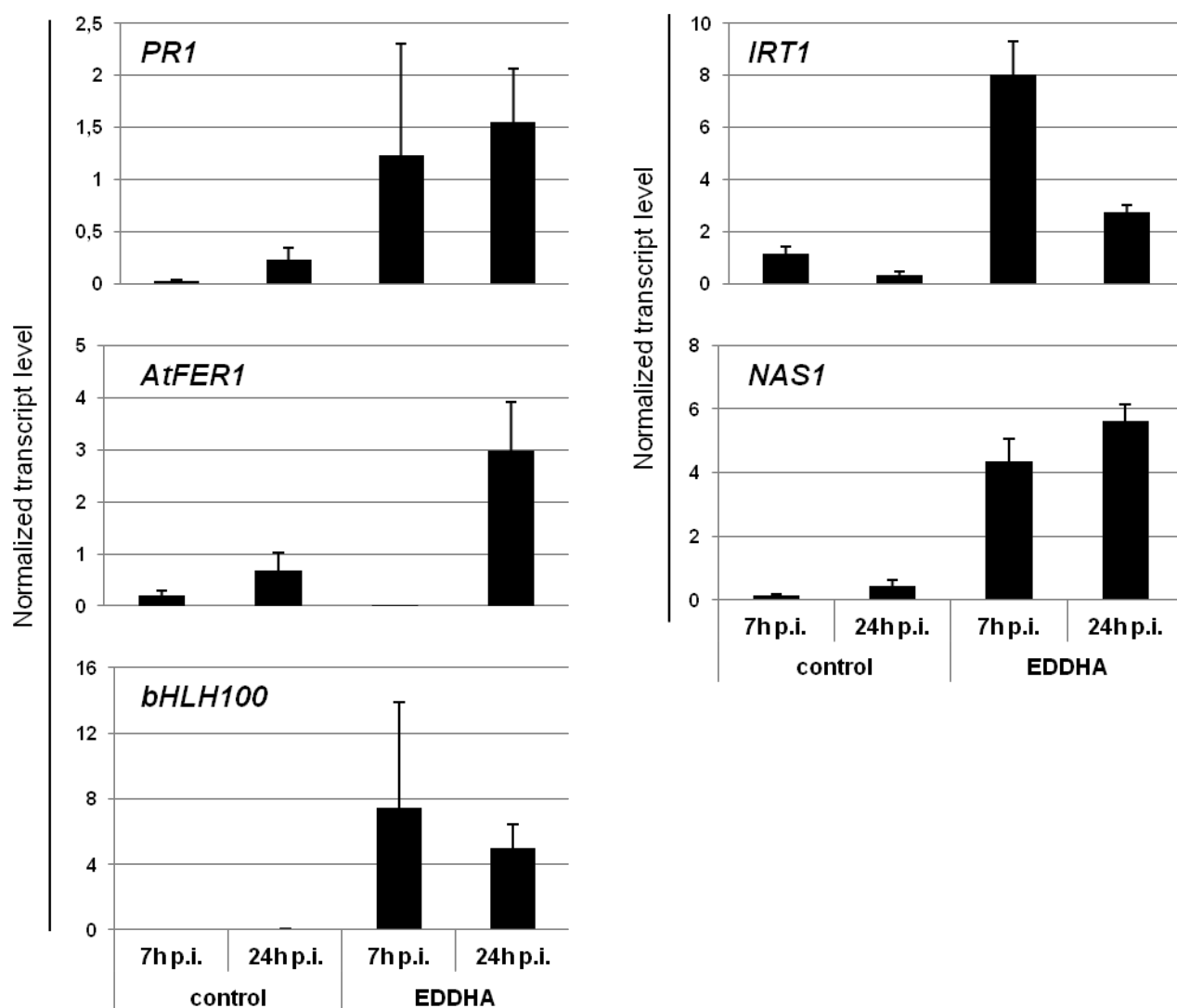


Figure 4: Expression profiles of DFO-up genes in leaves and roots in response to EDDHA treatment. Leaves of Col-0 hydroponically grown plants were infiltrated with 1 mM EDDHA or control solution (5 mM NaOH). Leaves and roots were harvested at indicated times after treatment. The expression of indicated genes was monitored by qRT-PCR from leaves (*PR1*, *AtFER1*, *bHLH100*) or roots (*IRT1*, *NAS1*). Gene expression was normalized against synthetic constitutive gene transcript level (*ACT*, *EF1α*). Experiments were performed three times with similar results. Representative data are shown. Bars: SD of the normalized ratio. For each point, 6 plants were used and 3 leaves per plant were infiltrated.

Expression profiles of a selection of DFO-up genes in response to other strong iron chelating molecules

Deferrioxamine is a tri-hydroxamate-type siderophore produced by several bacterial species from genera including *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* (Smits and Duffy, 2011). To know whether the activation of DFO-up gene expression could be triggered by a strong iron-chelating process, we decided to use another siderophore known to be produced by the pathogenic bacterium *D. dadantii*, but having a different chemical structure, the catechol type chrysobactin (CB, (Persmark et al., 1989)). We monitored the expression of a selection of DFO-up genes by qRT-PCR in leaves and roots of plants treated with CB by leaf infiltration (Fig. 2). We selected genes involved in two types of functions : *WRKY46* (Hu et al., 2012), *WRKY70* (Li et al., 2006), *Ahb1* (Mur et al., 2012) involved in plant defense and signaling; *bHLH38* (Yuan et al., 2008; Sivitz et al., 2012), *bHLH100*, *bHLH101* (Sivitz et al., 2012) involved in iron homeostasis and signaling. In roots, we monitored the expression of a gene involved in nicotianamine biosynthesis: *NAS1* (Klatte et al., 2009). Nicotianamine (NA) is a nonproteinogenic amino acid known to bind a range of metal ions, including Fe^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} (Curie et al., 2009). We also monitored the expression of the genes essential for iron uptake in *Arabidopsis* *IRT1* and *FRO2*.

We found that globally all the DFO-up selected genes were up-regulated by the two structurally distinct siderophores DFO and CB, in the same organ. In some cases the kinetics of up-regulation was different between CB and DFO. For instance the expression profile of *bHLH100* and *bHLH101* at 7 h p.i. and 24 h p. i. are not the same (Fig. 2). Leaf infiltration with 1 mM of the ferri-siderophore Fe-DFO failed to activate the expression of the immunity markers *WRKY46* and *AHB1*, and of the iron deficiency markers *bHLH100* and *bHLH38* in leaves (Fig. S3). These data confirm previous reports (Dellagi et al., 2009). Thus, DFO triggers defense and iron deficiency responses owing to its iron scavenging capacity. Chrysobactin and DFO are produced by microbes and thus we considered the possibility that plants could have evolved specific membrane receptors to recognize their iron free form. To test this hypothesis, we analyzed the effect of a synthetic iron chelator, the ethylenediamine-di(o-hydroxyphenylacetic) acid (EDDHA) which is not a natural product but usually used as a fertilizer of plants in its Fe-EDDHA form (Sequestrene®). We monitored the expression of a selection of DFO-up genes involved in defense and iron homeostasis functions, following leaf treatment with EDDHA. Interestingly, EDDHA infiltration in *Arabidopsis* leaves resulted in the up-regulation of the immunity related gene *PR1* and the iron homeostasis genes *AtFER1* and *bHLH100* in leaves; and the iron deficiency genes *IRT1* and *NAS1* in roots (Fig. 4). Together, these data strongly

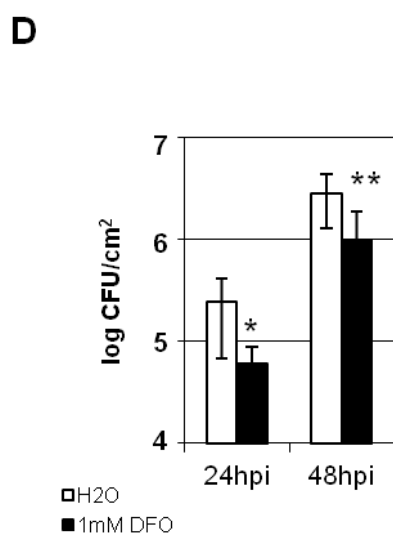
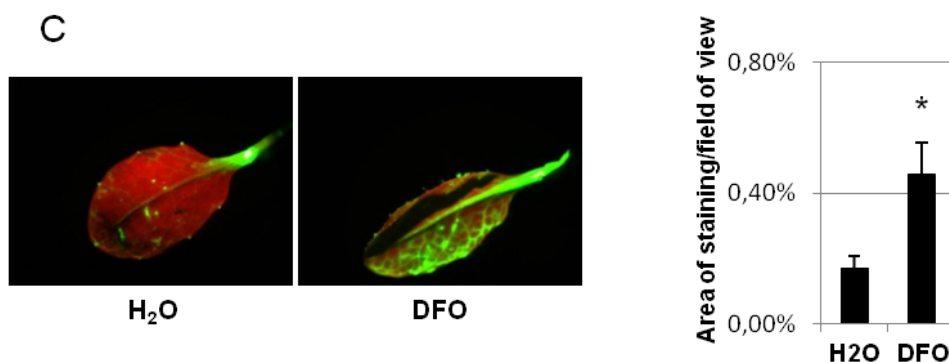
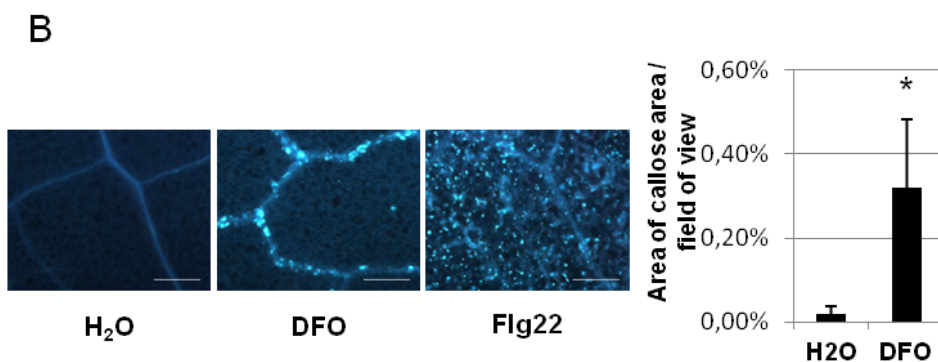
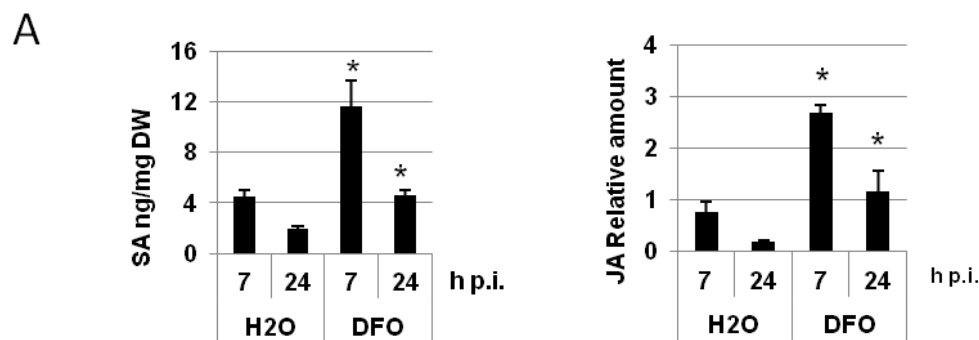


Figure 5: DFO triggers innate immune responses in Arabidopsis. Leaves of Col-0 hydroponically grown plants were infiltrated with indicated treatments. (A): Leaves were harvested at 7 h p.i. and 24 h p.i. and total SA was quantified. JA amounts were expressed relatively to the standard (see materials and methods). Bars=SE. * $P<0.05$ (Kruskal Wallis). (B): Picture and corresponding quantification of callose depositions detected with aniline blue staining in leaves 8 h after the indicated treatments. Bar = 200 μ m. (C): Picture and quantification of hydrogen peroxide staining in Arabidopsis leaves with the fluorescent dye DCFH-DA 8 h after indicated treatments. Bars=SE. * $P<0.05$ (Mann and Whitney). (D): Virulence suppression activity of DFO in *A. thaliana*. Col-0 leaves were infiltrated with DFO or water as control, followed by inoculation with the pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 24 h later. Average bacterial counts per area (\pm SE) are shown at indicated times after bacterial inoculation. Bars=SE. ** $P<0.01$ (Mann and Whitney). DW: dry weight. Experiments were performed three times at least with similar results. For each point, 6 plants were used and 3 leaves per plant were infiltrated.

suggest that the transcriptional activation of defense genes and iron homeostasis genes by siderophores is due to their strong iron chelation property.

Typical immune responses triggered by DFO

Transcriptome modifications triggered by the siderophore affect genes involved in the response to biotic stress. To determine whether this transcriptome signature was associated to physiological defense responses, we analyzed a set of physiological markers of the plant immunity program. Accumulation of two major defense signaling hormones was monitored : salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in leaves and roots of DFO-treated plants by LC-MSMS at the time points 7 h p.i. and 24 h p.i. Interestingly, leaves treated with DFO accumulate SA and JA to significantly higher levels than do the non-treated controls (Fig. 5A). However, no significant accumulation of SA or JA was observed in the roots (Fig. S4). Another typical immune response known to be triggered by most pathogens and MAMPs is callose deposition. Leaf infiltration with DFO resulted in significant callose deposition 8 h p.i. which was strictly localized along the veins (Fig. 5B). This pattern of callose deposition was very reproducible and differs from the well-described pattern of callose deposition triggered by the archetypal MAMP Flg22 peptide, which appears in the inter-vein zone. We wondered whether the restriction of callose deposition along the vascular system in response to DFO was specific to experimental conditions. To address this point, we infiltrated plants grown in the same conditions as those infiltrated with DFO and in the same batch of experiments, with Flg22 peptide. As indicated in Fig. 5B, we observed typical callose deposition in the inter-vein zone with Flg22 (Gomez-Gomez et al., 1999; Denoux et al., 2009; Luna et al., 2011). To examine whether the particular pattern of callose deposition was specific to the siderophore DFO, *Arabidopsis* leaves were infiltrated with other siderophores: ferrichrome (another hydroxamate-type molecule), and chrysobactin (Fig. S5). Both siderophores caused callose deposition along veins following the same pattern as that of DFO. Thus, siderophores specifically trigger localized callose deposition along the vascular system.

Accumulation of ROS is known to be one of the most rapid processes activated in plants upon pathogen attack, leading to the strengthening of cell walls, defense gene expression and pathogen killing (Torres, 2010). Several ROS-related genes were DFO differentially regulated in leaves (Table S4). Accumulation of ROS in response to DFO was investigated using the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). Leaves were infiltrated with DFO or distilled water as a control. Fluorescence could be observed in the DFO-infiltrated part of leaves at 8 h p.i. while very weak fluorescence was visible in control leaves indicating that the siderophore induces accumulation of H₂O₂ (Fig. 5C).

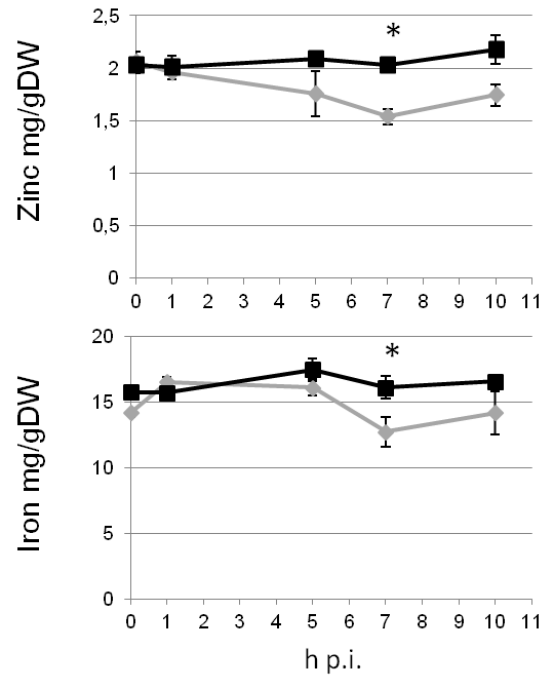


Figure 6: Time course of iron and zinc concentration in roots of DFO treated plants. Plants were harvested at indicated times after 1 mM DFO (black) or water (gray) infiltration into leaves. Metal concentration was determined by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) on roots. Bars=SE. * $P < 0.05$ (Mann and Whitney). DW: dry weight. Experiments were performed three times with similar results. For each point, 6 plants were used and 3 leaves per plant were infiltrated.

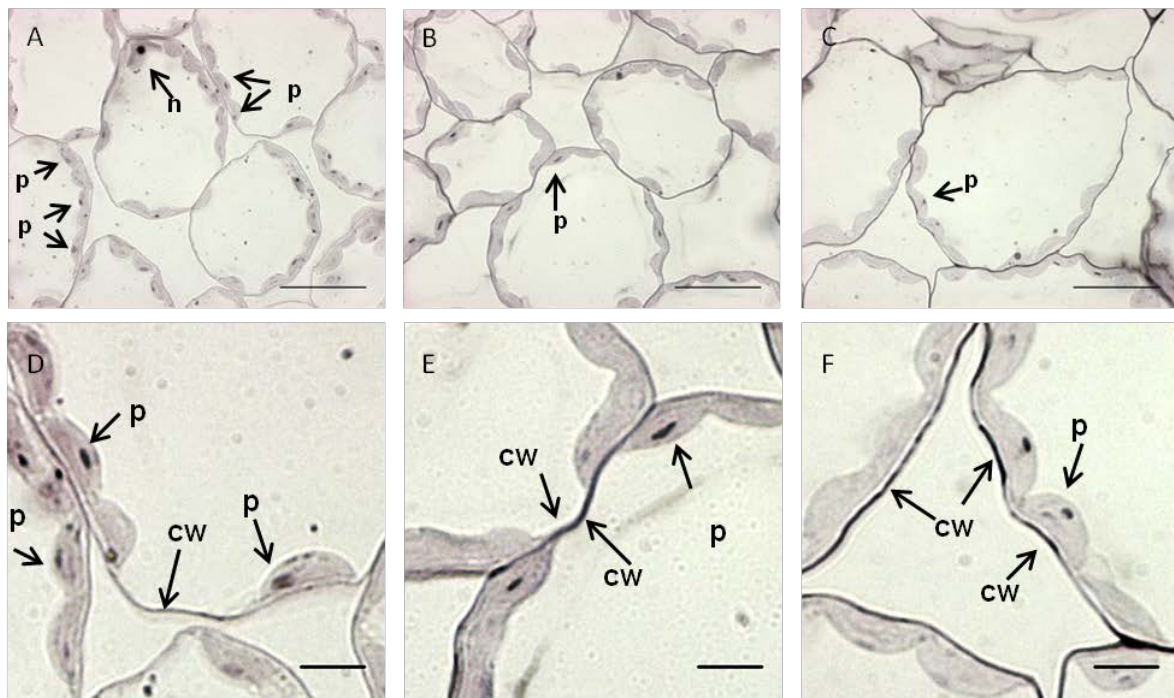


Figure 7: Modification of iron distribution in leaf tissues in response to siderophores. Leaves of Col-0 hydroponically grown plants were infiltrated with 1 mM CB (B and E), 1 mM DFO (C and F) or distilled water as control (A and D). Leaves were harvested 5 h p.i. Perls/DAB-H₂O₂ staining of thin sections was performed. Scale bar: 20 μ m (A, B, C) and 5 μ m (D, E, F). Pictures D, E and F correspond to magnified zones of A, B and C respectively. p: plastid, cw: cell wall, n: nucleus.

As highlighted by McCann *et al.* (2012), virulence suppression assays can be considered one of the best methods to monitor the induction of the immune system because it directly assesses whether the application of a candidate elicitor results in a decrease in susceptibility i.e. an increase in immunity. Virulence suppression assays using DFO as a potential elicitor were then undertaken. Arabidopsis leaves were pre-inoculated with DFO followed by an infiltration 24 h later with the virulent bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) which is commonly used to test the elicitors' effect (McCann *et al.*, 2012). Bacterial populations were monitored in control and DFO-treated leaves at 24 h and 48 h after bacterial inoculation. Although bacterial populations increased in DFO-treated leaves between 24 and 48 h p.i., they were significantly reduced compared to controls indicating that a virulence suppression of *Pst* DC3000 was caused by DFO (Fig. 5D). To determine whether the SA pathway is required for this virulence suppression, the same experiment was performed on *sid2* plants deficient in SA biosynthesis (Wildermuth *et al.*, 2002). The data Fig. S6 show that the protection is compromised in *sid2* plants compared to WT plants. In vitro growth of *Pst* DC3000 was not affected by DFO ruling out a possible direct effect of the siderophore on bacterial populations (Fig. S6). Taken together, these results show that siderophores are canonical elicitors of plant innate immunity.

Iron mobilization following Arabidopsis leaf treatment with DFO

Arabidopsis responds to leaf infiltration with DFO by transcriptional modification of metal homeostasis genes in leaves and roots and in particular, iron homeostasis genes are strongly affected. Because DFO specifically binds iron, and because *IRT1* is strongly up-regulated by the siderophore, we monitored metal concentrations of Fe, Zn and Mn known to be transported by this protein (Korshunova *et al.*, 1999). Metal quantification in leaves treated with DFO did not reveal any differences compared to the controls (data not shown). Interestingly, root concentrations of Zn and Fe were increased between 5 h and 10 h following leaf infiltration of DFO (Fig. 6). No significant difference was observed in Mn concentrations (data not shown). Thus, the metal concentration profile of roots following DFO treatment is consistent with a signature of the activation of the transporter *IRT1* which transports iron and zinc (Korshunova *et al.*, 1999; Vert *et al.*, 2002). In most reports, uptake of Mn and Zn are enhanced under conditions of iron deficiency (Long *et al.*, 2010; Barberon *et al.*, 2011). In our case, iron deficiency is different in that it is not applied by removing the metal from the medium. Iron and zinc transport by *IRT1* could well outcompete Mn uptake under our conditions as previously described with *IRT1* expressing yeasts (Korshunova *et al.*, 1999).

The absence of modification in leaf iron content in response to DFO prompted us to investigate whether local iron distribution was modified. For this purpose, iron localization at the tissue level was

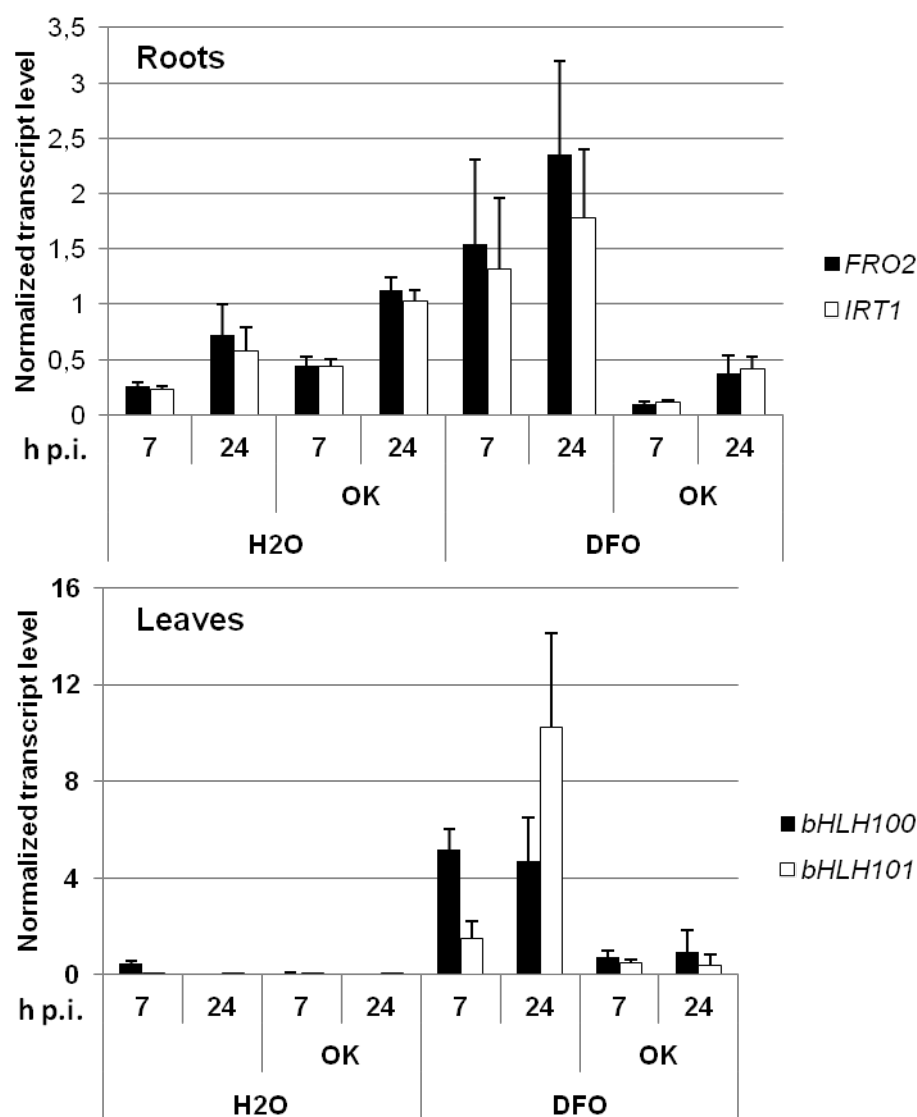


Figure 8: Role of protein dephosphorylation in iron homeostasis genes expression in response to DFO. Leaves of hydroponically-grown plants were infiltrated with distilled water or 1 mM DFO. Leaves and roots were harvested at indicated times after treatment. Iron homeostasis gene expression was monitored by qRT-PCR using cDNA from leaves (*bHLH100*, *bHLH101*) or roots (*FRO2*, *IRT1*). Gene expression was normalized against synthetic constitutive gene transcript level (*ACT*, *EF1 α*). OK: Okadaic acid. Experiments were performed three time with similar results. Representative data are shown. Bars: SD of the normalized ratio. For each point, 6 plants were used and 3 leaves per plant were infiltrated.

analyzed on CB and DFO treated leaves using the recently developed method based on Perls'-DAB-H₂O₂ staining (Roschztardt et al., 2010). Pictures Fig. 7 indicate that cells have globally the same aspect in control and siderophore treated tissues, showing that the treatment did not alter cellular integrity. Iron was mainly detected at the cell wall, in the plastids and in the nucleolus as was recently described (Roschztardt et al., 2011). Interestingly, the number of iron spots (presumably containing ferritin) visible in the plastids was reduced in DFO and CB treated leaves when compared to control. In addition, cell walls of siderophore treated tissues showed some highly stained zones that we did not observe in the control suggesting accumulation of iron in these zones. These data indicate that siderophores trigger modifications of iron distribution visible at the cellular level in leaf tissues.

Involvement of phosphorylation events in the activation iron deficiency response by DFO

The DFO transcriptome results indicated that a large number of signal transduction-related genes including kinases, phosphatases and transcription factors were up-regulated in leaves. To check whether the transcriptome data reflect a potential role of kinases and/or phosphatases in the DFO triggered responses, we used a pharmacological approach. Leaves were treated with the protein kinase inhibitor (K252a, (Davies et al., 2000)) or the phosphatase inhibitor (okadaic acid, (Mackintosh and Cohen, 1989)), combined with the siderophore DFO. Controls consisted of treatment with the inhibitor alone. We analyzed the expression of iron deficiency markers in leaves and roots. The kinase inhibitor K252a did not have a significant effect on the expression of iron homeostasis genes (data not shown). However, the protein phosphatase type 1 and 2A inhibitor okadaic acid prevented the up-regulation of the iron deficiency markers *IRT1* and *FRO2* in roots and *bHLH100* and *bHLH101* in leaves in response to DFO (Fig. 8). These data suggest the possible involvement of phosphatases in the activation of iron deficiency responses by DFO.

Role of *IRT1* in the siderophore response

Our previous data show that the activation of the SA pathway by siderophore treatment is compromised in iron starved plants indicating that iron is a prerequisite for this response (Dellagi et al., 2009). In addition, the above described data show that the siderophore DFO is able to trigger a modification of the plant iron and zinc concentrations which could be due to an *IRT1* transport activity. To determine whether the immune responses triggered by siderophores involve the root metal transporter *IRT1*, we analyzed key immune responses in an *irt1* mutant in response to DFO. For this purpose, callose deposition was monitored in the *irt1-1* mutant (Vert et al., 2002) and in its *Ws* parental line (Fig. 9). Callose deposition was visible along veins in *Ws* siderophore treated leaves indicating that this response was not specific to the Col-0 ecotype. Interestingly, *irt1-1* mutant plants

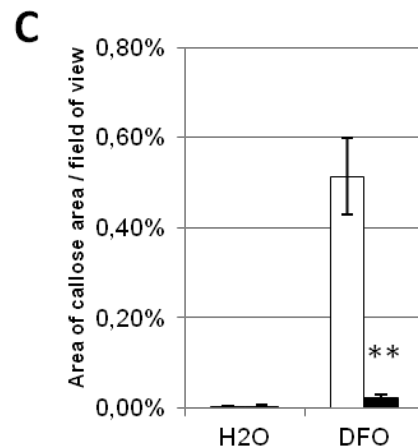
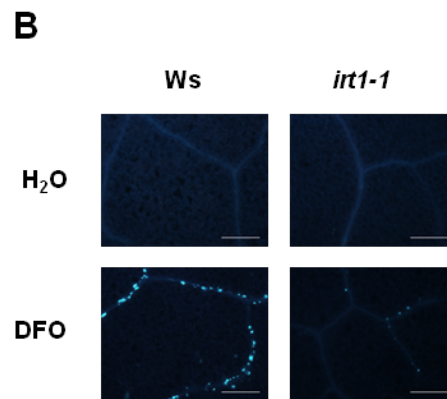
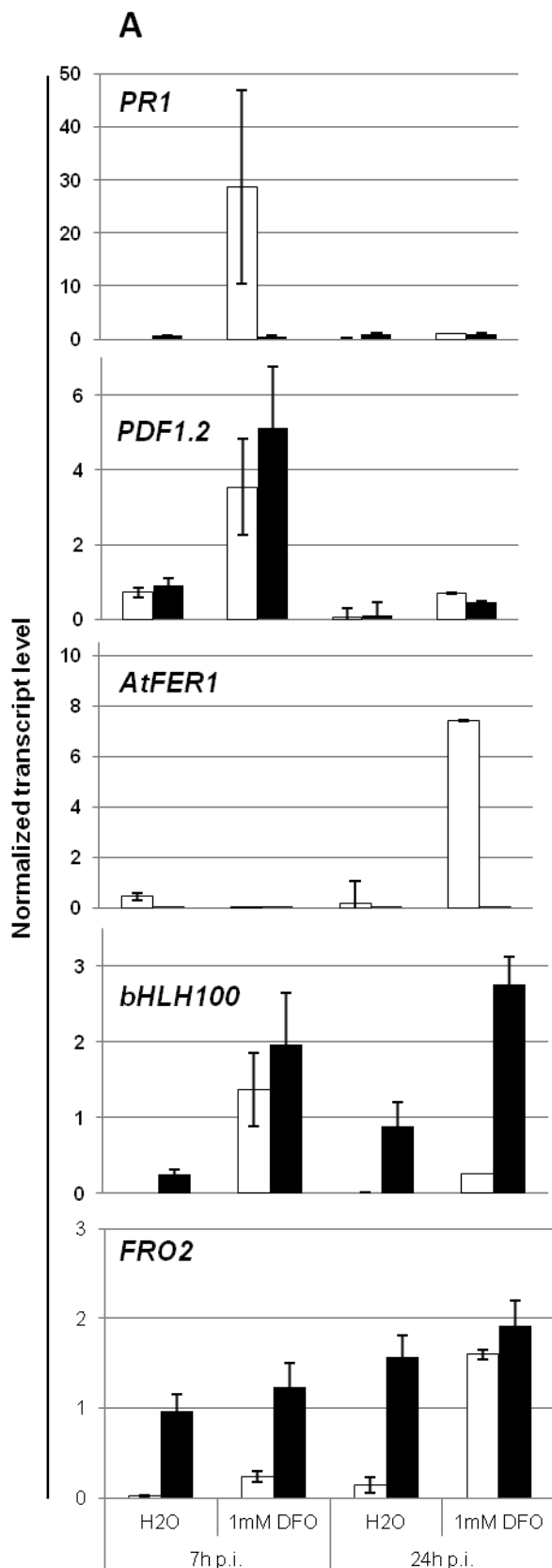


Figure 9: Role of IRT1 in defense and iron homeostasis gene expression to DFO. (A) : Leaves of hydroponically grown plants were infiltrated with 1 mM DFO or water as control. Leaves and roots were harvested at indicated times after treatment. The expression of indicated genes was monitored by qRT-PCR from leaves (*PR1*, *PDF1.2*, *AtFER1*, *bHLH100*) or roots (*FRO2*). Gene expression was normalized against synthetic constitutive gene transcript level (*ACT*, *EF1α*). White bars: Ws, black bars: *irt1-1* mutant. Experiments were performed three times with similar results. Representative data are shown. Bars: SD of the normalized ratio. (B): Pictures of callose depositions detected with aniline blue staining in leaves 8 h after the indicated treatments. Bar = 200 μm. (C): Quantification of callose depositions in leaves 8 h p.i.. ** $P < 0.01$ (Mann and Whitney). Experiments were performed three times with similar results.

failed to accumulate callose in response to DFO. We also monitored the expression of key defense marker genes. In Ws plants, DFO treatment provoked the up-regulation of the SA marker gene *PR1*, and the ethylene jasmonate (ET/JA) marker gene *PDF1.2*. The up-regulation of the SA marker *PR1* was strongly reduced in *irt1-1* mutant plants while the up-regulation of the ET/JA marker *PDF1.2* was not altered. These results strengthen the key role of SA in the crosstalk between iron homeostasis and defense in Arabidopsis (Dellagi et al., 2009). We investigated the effect of *irt1-1* mutation in the expression of iron homeostasis genes following DFO treatment. The expression of *AtFER1* is rapidly repressed (7 h p.i.) then up-regulated in DFO-treated Ws leaves (24 h p.i.), however, this up-regulation is completely abolished in *irt1-1* mutant plants. The expression of *FRO2* is constitutively high in *irt1-1* suggesting that this mutant is constantly sensing iron deficiency and that DFO treatment does not modify the expression of *FRO2*. Interestingly, the iron deficiency responsive transcription factor gene *bHLH100* is up-regulated to similar levels in Ws and *irt1-1* mutant leaves 7 h p.i. Taken together, these data indicate that a functional *IRT1* gene is required for the activation of immunity responses and the fine tuning of iron homeostasis gene expression in response to siderophores.

Role of *IRT1* in the plant defense against *Dickeya dadantii*

The above data suggest that *IRT1* through its metal transport activity could be involved in the modulation of defense responses and iron homeostasis in Arabidopsis. This prompted us to test the susceptibility of the corresponding mutant to a plant pathogen for which iron is an important factor controlling the infection process, the enterobacterium *Dickeya dadantii* 3937 (Dellagi et al., 2005; Segond et al., 2009). Leaves of 5 week old plants grown on soil were inoculated with a bacterial suspension of 10^7 CFU/mL. Fig. 10 shows that the severity of symptoms is increased in *irt1-1* mutant plants compared to the wild type. These data indicate that *IRT1* is involved in the basal resistance to the necrotrophic pathogen *D. dadantii*.

Discussion

In this work, we investigated the plant response to siderophores. Siderophores were infiltrated in leaves and the plant response was analyzed in leaves and roots using microarrays. Because siderophores specifically bind iron, we expected iron homeostasis to be the most important process to be modulated. To our surprise, our data show that plant immunity is the most important physiological process activated by DFO in the treated leaves. In roots, the major process being activated is heavy metal homeostasis. We showed that owing to their strong iron scavenging

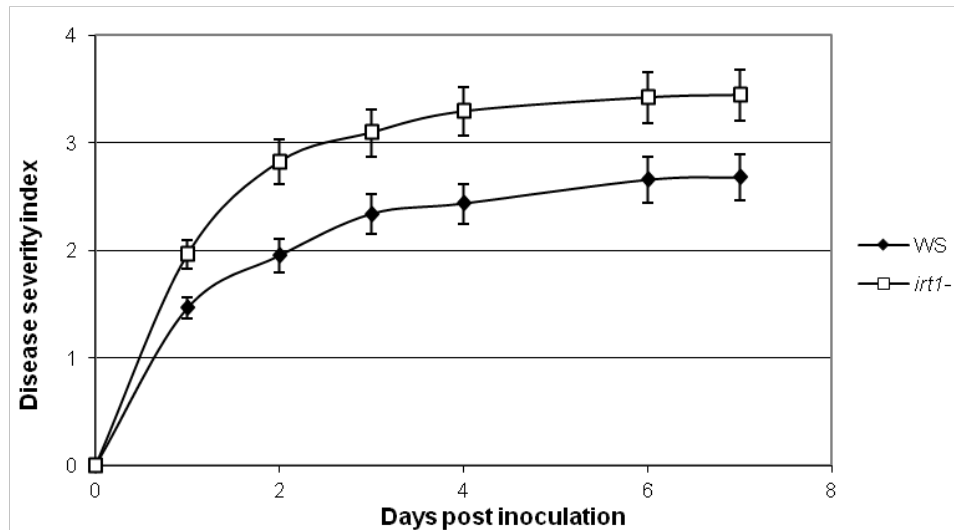


Figure 10: Role of *IRT1* in defense against *D. dadantii*. Leaves were inoculated with a *D. dadantii* bacterial suspension containing 10^7 C.F.U. mL^{-1} . Mean (\pm SE, $n=30$) of disease severity index scored at indicated times after inoculation is represented. Experiments were performed three times with similar results.

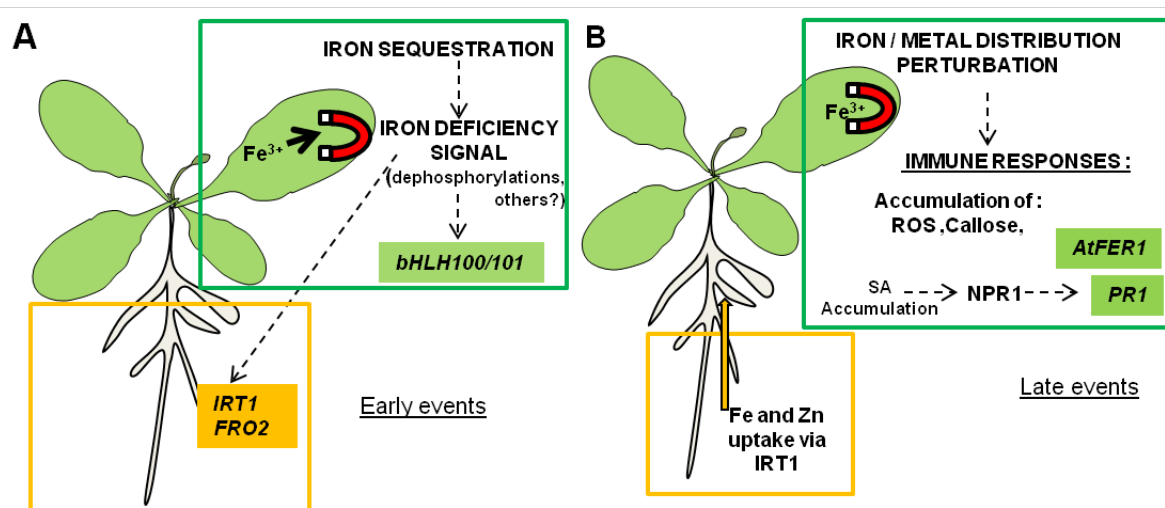


Figure 11. Model showing the responses of Arabidopsis to strong iron scavengers.

(A) Early events : Iron scavengers (EDDHA or siderophore) chelate iron in the surrounding tissue of the leaf and trigger an iron deficiency signal. This iron deficiency signal will be relayed by a signaling cascade which potentially involves dephosphorylations and leads to the up-regulation of *bHLH100* and *bHLH101* in leaves and of *IRT1* and *FRO2* in roots.

(B) Late events: Activation of *IRT1* expression results in the uptake of iron and zinc at the root level indicated by the orange thick arrow. This metal uptake is likely to cause a cellular stress in the treated leaves. The most important immunity and iron homeostasis markers are indicated. NPR1 is a protein involved in the SA signal transduction pathway shown to be required for PR1 activation by siderophores (Dellagi et al., 2009). Dotted arrows indicate that the activation is not direct. Genes up-regulated are surrounded by a colored box. Green and orange boxes refer to events occurring in leaves and roots respectively.

capacity, the siderophores modify iron distribution in leaf tissues and provoke metal homeostasis perturbations which are likely to trigger typical immune responses. Our data show that the root metal transporter IRT1 plays an important role in the establishment of the plant response to the siderophores and in basal resistance to *D. dadantii*, indicating that heavy metal traffic and immunity are highly interconnected.

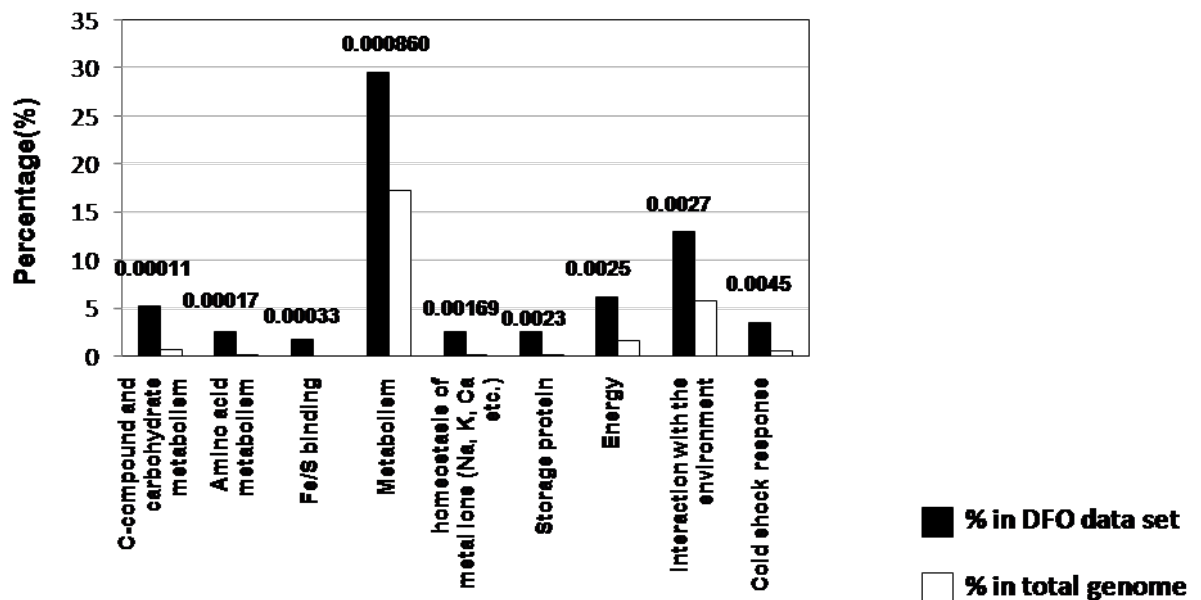
Siderophores cause local and systemic disturbance of plant iron homeostasis

Several lines of evidence indicate a disturbance in iron homeostasis in the leaves and the roots following siderophore treatment: differential transcription of iron deficiency related genes and transient accumulation of iron and zinc in roots following DFO treatment. These data suggest that the siderophore triggers a local signal of iron deficiency at the site of inoculation which is associated with the up-regulation of metal transporters at the root level. The well characterized *FIT*, a gene coding a bHLH transcription factor which regulates the expression of major genes involved in the iron deficiency response like *IRT1* and *FRO2* (Colangelo and Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004), was not found amongst the up-regulated genes. Furthermore, qPCR experiments failed to detect any accumulation of *FIT* transcript neither in leaves nor in roots (data not shown). The genes coding for the transcription factors *bHLH100* and *bHLH101* are strongly up-regulated in DFO-treated leaves. Using the tool SIGNATURE of Genvestigator, we found that data set of genes differentially expressed between Col0 and the double mutant *bhlh100 bhlh101* are very similar to the DFO transcriptome gene data set (Fig. S2). These two transcription factors have been recently shown to be involved in plant adaptation to iron deficiency probably by the fine tuning of the iron deficiency response signaling independent of FIT (Sivitz et al., 2012). In the light of these data, it would be worth testing the involvement of *FIT*, *bHLH100* and *bHLH101* in the siderophore response and in plant resistance to pathogens.

In an attempt to tackle the question of possible modifications in iron distribution, we quantified metals in DFO treated leaves. No changes were detected in comparison with controls. Interestingly, *AtFER1* gene down-regulation followed by an up-regulation after siderophore treatment is an indication that iron deficiency followed by iron excess is likely to occur in the treated tissue (Gaymard et al., 1996; Briat et al., 2010). Histological analysis of iron distribution allowed us to observe some modifications in iron localization following CB and DFO treatment. A reduction in the number of iron spots in plasts was observed 5 h p.i. which. These spots are likely to correspond to ferritin proteins, which is in agreement with an early down regulation of *AtFER1* in response to siderophores (Fig. 2). Increase in iron staining in some sections of the cell walls of siderophore treated tissues suggests accumulation of iron in cell walls. Investigation of the mechanism underlying this process deserves further attention.

A

DFO-down in leaves 7h p.i.



B

DFO-down in leaves 24h p.i.

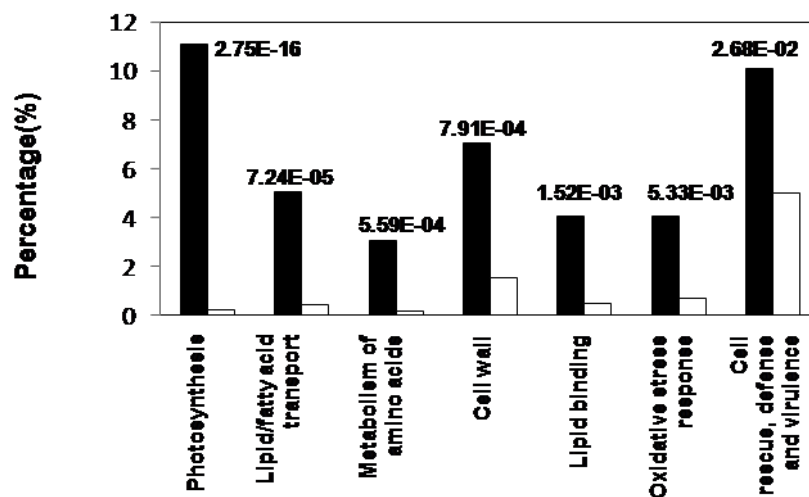


Figure S1: Over represented functional categories in data set of down regulated genes. In leaves (A) DFO-down genes 7h p.i. and (B) 24 h p.i. according to analysis performed on the website Funcat (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>). P-values are indicated for each category.

In roots, an accumulation of iron, and zinc could be observed after leaf treatment with DFO. The timing of this accumulation (7 h p.i. to 10 h p.i.) is consistent with the timing of *IRT1* up-regulation (between 7 h p.i. and 24 h p.i.). Together, our results show that siderophores provoke modifications of metal distribution in the plant.

We have observed a drastic effect of the protein phosphatase inhibitor okadaic acid on the expression of iron deficiency responsive genes in leaves (*bHLH100*, *bHLH101*) and in roots (*IRT1*, *FRO2*) triggered by DFO. These data suggest that protein phosphatases likely to be localized in leaves could be involved in the activation of this response. Very few data are available concerning the role of phosphorylation/dephosphorylation in the signal transduction cascade activated upon iron deficiency. A recent study identified 45 differentially phosphorylated proteins in Arabidopsis roots of iron starved plants (Lan et al., 2012). In some cases, iron deficiency increased phosphorylated forms of proteins, whereas in other cases desphosphorylated forms were accumulated, indicating the involvement of both phosphatases and kinases. Interestingly, iron-induced *AtFER1* mRNA abundance in response to excess iron is decreased by okadaic acid (Arnaud et al., 2006). All these data point to the need to characterize dedicated kinases and phosphatases involved in the iron deficiency response.

Siderophores trigger an immunity program

Using a transcriptome approach, we found that biotic stress is the major process triggered by the siderophore DFO. We observed the activation of immunity markers by several siderophores and by the synthetic iron chelator EDDHA, while no effect was observed in response to the ferri-siderophore complexes (Fig S3, (Dellagi et al., 2005; Dellagi et al., 2009). These results indicate that strong iron scavenging *per se* is a mechanism of immunity elicitation.

To validate the biological relevance of the transcriptome data, we performed a set of experiments to analyze typical immune responses known in Arabidopsis. Thus, we have shown that the SA and JA defense hormones accumulate in the leaves of treated plants. This was consistent with the recent report indicating that CB causes accumulation of SA in Arabidopsis leaves (Dellagi et al., 2009). No accumulation of these hormones was detected in roots suggesting that there is no regulatory effect of these hormones towards the differentially regulated root genes (Fig. S4). The accumulation of callose is a very powerful indicator of the immunity status of the plants because it has been shown that callose deposition is correlated with the plant's susceptibility or resistance and can be suppressed by microbial effectors (Luna et al., 2011). We found that siderophores of different structures, i.e. hydroxamates (DFO, ferrichrome) and catechol (CB), trigger callose deposition in the leaves. The pattern of callose deposition was specifically located along veins. Metals have been



Figure S2: Most similar experiments to DFO transcriptome. The 100 most up-regulated genes and 100 most down-regulated genes in leaves 7 h p.i. were compared to the Genevestigator "perturbation" database using the "signature" tool (<https://www.genevestigator.com/gv/doc/signature.jsp>). The list of the 50 most similar experiments based on expression ratios is shown.

described as activators of callose deposition in diverse plant tissues (Chang et al., 1999; Kartusch, 2003; Pirsellova and Matusikova, 2013). In particular, non-toxic levels of cadmium were shown to cause accumulation of callose in leaf vascular systems, a process reminiscent of what we observe in our system (Ueki and Citovsky, 2002, 2005). Interestingly, heavy metals could provoke oxidative damage leading to callose deposition (Chang et al., 1999). Thus, it is likely that metal distribution perturbations cause ROS accumulation.

Accumulation of ROS is a hallmark of plant stress response (Torres, 2010). ROS accumulation in DFO treated leaves is in agreement with the differential expression of a number of genes devoted to the management of oxidative damage in response to DFO (Table S4). Reactive oxygen species accumulation was observed in tobacco cell cultures treated with the siderophore pseudobactine produced by beneficial *P. fluorescens* WCS374 (van Loon et al., 2008). However, these data seem contradictory with the overwhelming evidence that DFO is a widely used antioxidant for therapy of different pathologies including iron overload, Alzheimer disease and cancer (Nunez et al., 2012). Our interpretation of these apparent conflicting data is that pro-oxidant and antioxidant effects may occur depending on the concentrations used and the physiological conditions prevailing during the experimental time. It is likely that the early effect is antioxidant since iron scavenging has an anti-Fenton action (Jomova and Valko, 2011). But then, chelation can generate a local lack of available iron triggering a transient modification of the metal distribution as observed by Perl's-DAB-H₂O₂ staining, which eventually can result in ROS formation.

Finally, the observations described above are consistent with the virulence suppression assay. Indeed, our data show that in DFO-treated leaves 24 h before infection with the virulent pathogen *Pst* DC3000, bacterial populations are reduced compared to control. Interestingly, another report on defense activation by siderophores in leaves shows that infiltration of *Eucalyptus urophylla* leaves with the purified siderophore pseudobactine conferred protection against the bacterial wilt agent *Ralstonia solanacearum* (Ran et al., 2005). Thus siderophores can be considered as having potentially two opposite functions during infection processes being both pathogenesis effectors involved in plant invasion, and defense elicitors. This dual property is also found in some protein effectors secreted by bacterial and fungal pathogens (Bent and Mackey, 2007)

Activation of immunity by iron chelation was described in animal cells where DFO was used as chelating agent. Indeed, a large scale transcriptome analysis of DFO treated intestinal epithelial cells indicated that several genes involved in inflammatory signaling were activated at the transcriptional level (Choi et al., 2004). Incubation of human intestinal epithelial HT-29 cells with DFO increased the expression of IL-8 mRNA, as well as the release of IL-8 protein (Choi et al., 2004; Choi et al., 2007).

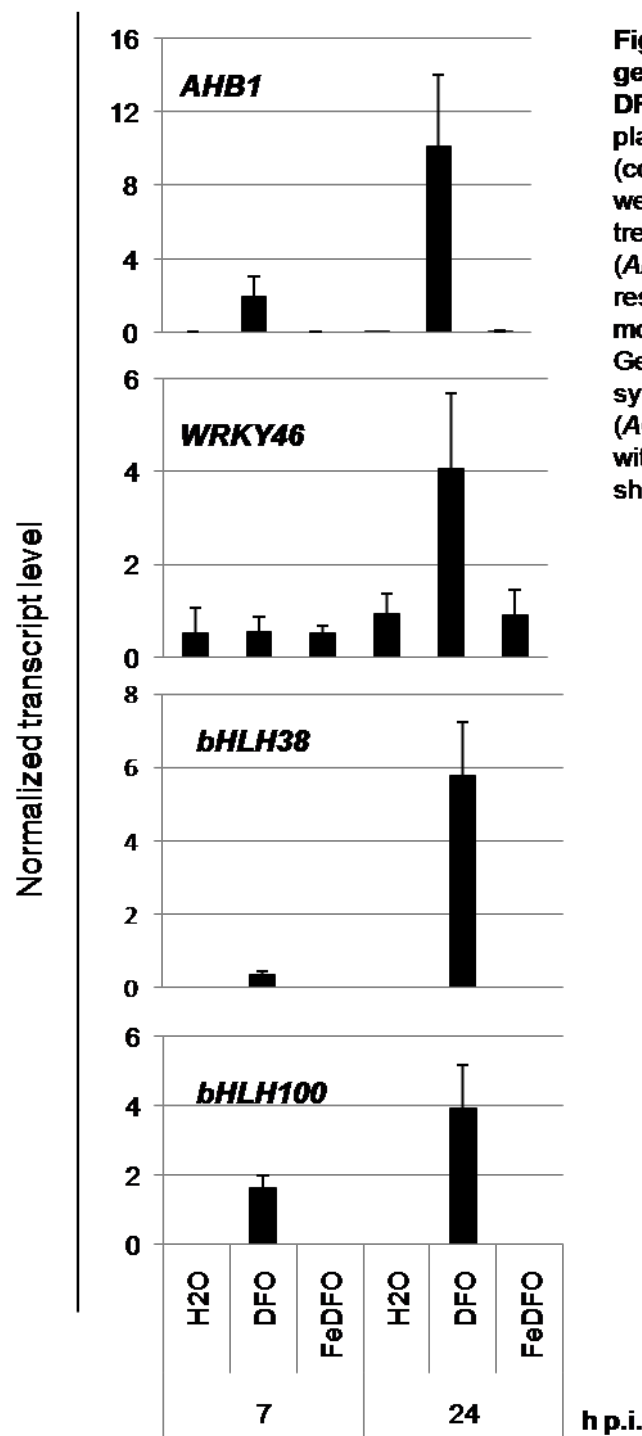


Figure S3: Expression profiles of DFO-up genes in leaves in response to DFO or Fe-DFO. Leaves of Col-0 hydroponically grown plants were infiltrated with distilled water (control), 1 mM DFO or 1 mM Fe-DFO. Leaves were harvested at indicated times after treatment. The expression of immunity genes (*AHB1* and *WRKY46*) and iron deficiency responsive genes (*bHLH38* and *bHLH100*) was monitored by qRT-PCR using cDNA from leaves. Gene expression was normalized against synthetic constitutive gene transcript level (*ACT*, *EF1α*). Experiments were repeated twice with similar results. Representative data are shown. Bars: SD of the normalized ratio.

The chemokine CCL20 involved in the pro-inflammatory responses as well as the adaptive response accumulates in epithelial intestinal cells in response to DFO indicating that siderophore can also trigger adaptive immune responses (Lee et al., 2005). In these reports, the activation of immune responses are reversed by the use of ferri-siderophore indicating that the immune-stimulating effect of DFO is related to its iron chelating capacity. The accumulation of IL-8 in HT-29 epithelial intestinal cells via DFO requires the activity of the protein kinase C, the MAP kinases ERK1/2 and p38 (Choi et al., 2007; Choi et al., 2007). Thus, DFO can display an immunostimulating activity in animal cells, via activation of phosphorylation cascades. Interestingly, these effects caused by DFO on animal cells reveal some similarities to those observed in our plant system since in both models typical immune responses and phosphorylation cascades are triggered.

A model for the mechanism of immunity activation by siderophores

We provide physiological and genetic evidence that metal homeostasis and defense are linked. We show that iron sequestration by siderophores or synthetic chelators is a novel mechanism triggering typical immune responses in plants. Siderophores are produced by virtually all organisms. Thus, they can play important roles during plant-microbe interactions either pathogenic or saprophytic. Neema et al. (1993) reported that in *Saintpaulia* leaves infected with *D. dadantii*, as much as 100 μ M CB siderophore can be detected, thus 100 μ M is compatible with physiological conditions. Our experiments were performed with a siderophore concentration (1 mM) ten times higher than physiological concentrations potentially produced by a pathogenic bacterium. A simple calculation considering that leaves contain 100 μ g Fe/g DW allowed us to find that infiltration of 1 mM siderophore consisted of a ratio Fe:siderophore of about 1:10, while 100 μ M consists of a 1:1 ratio. We triggered plants with DFO at 10 μ M, 100 μ M and 1 mM and we monitored callose deposition and the expression of the immunity marker gene *WRKY46*. Our data indicate that immunity markers (callose and *WRKY46*) are activated both at 100 μ M and at 1 mM but the intensity of the response was higher at 1mM (Fig. S8). Under these conditions, we could detect *IRT1* up-regulation only at 1mM. Collectively, these data allowed us to consider that our results were obtained with a siderophore concentration that mimics physiological conditions but with higher amplitude. Cellular integrity was unaffected by 1mM siderophore (Fig. 7).

Our results point to *IRT1* as a pivotal element required for the full activation of defense gene markers as well as for callose deposition in response to DFO, and for basal resistance to the pathogenic bacterium *D. dadantii*. The question that remains to be answered is: how does the IRT1 protein contribute to the activation of immunity?

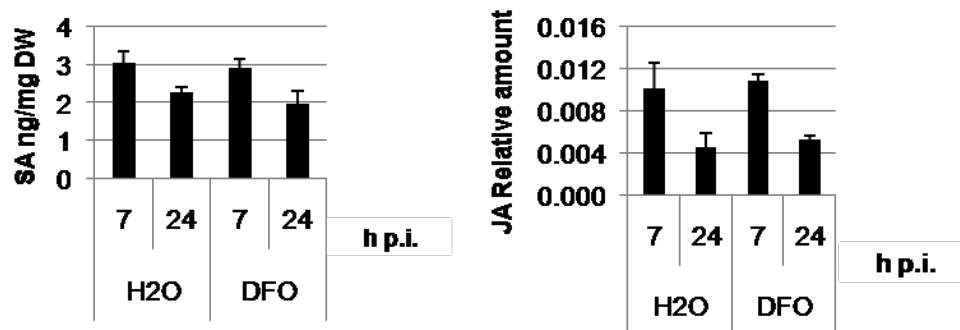


Figure S4: Deferrioxamine does not trigger accumulation of JA nor SA in roots. Leaves of Col-0 hydroponically grown plants were infiltrated with distilled water (H₂O) or with 1 mM DFO. Roots were harvested at 7 h p.i. and 24 h p.i. and total SA was quantified. JA amounts were expressed relatively to the standard (see materials and methods). Bars=SE. No statistical differences were observed between control and DFO treatments (Kruskal Wallis).

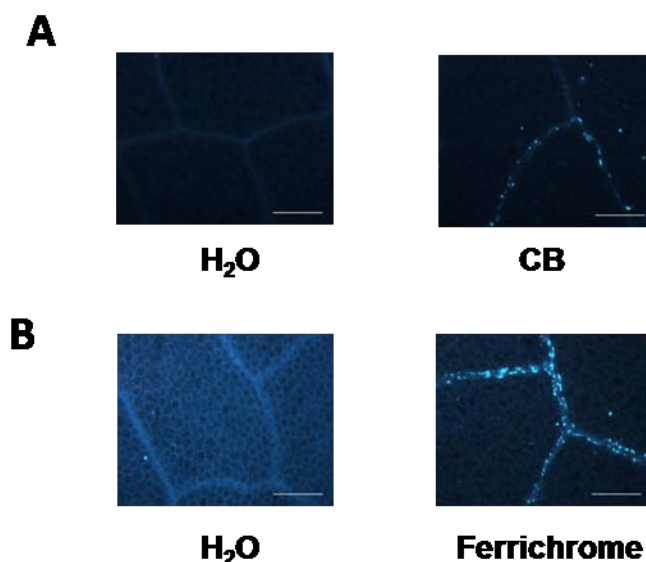


Figure S5: Chrysobactin and ferrichrome trigger callose deposition. Leaves of hydroponically-grown Col-0 plants were infiltrated with 1 mM CB (A) or 1mM ferrichrome (B). Representative pictures of callose depositions detected with aniline blue staining in leaves 8 h after the indicated treatments are shown. Bar = 200 μm.

We have previously shown that plants starved for iron are unable to activate the SA pathway nor to up-regulate *AtFER1* gene in response to siderophore (Dellagi et al., 2009). In addition, Kieu *et al.* (2012) reported that in iron starved plants, callose deposition and ROS production was compromised in response to the bacterium *D. dadantii*. These data point to iron as a major actor in immunity activation in Arabidopsis.

When grown in iron replete medium like in our conditions, the *irt1-1* mutant has no defect in iron concentration, as it was reported by Barberon et al. (2011) (Fig. S7). Thus, defect in iron uptake rather than in iron concentration is likely to compromise immune responses in the *irt1-1* mutant. As a consequence, we can conclude that active iron uptake via IRT1 plays a pivotal role in defense response activation upon siderophore treatment.

Concentrations of Mn and Zn are reduced in *irt1-1* mutant leaves (Fig. S6). This is consistent with the fact that IRT1 transports Mn and Zn (Korshunova et al., 1999; Vert et al., 2002). These results suggest that these metals could also be involved in immunity in Arabidopsis. Alternatively, reduced immunity of *irt1-1* mutant plants could be due to inappropriate iron localization in leaf tissue.

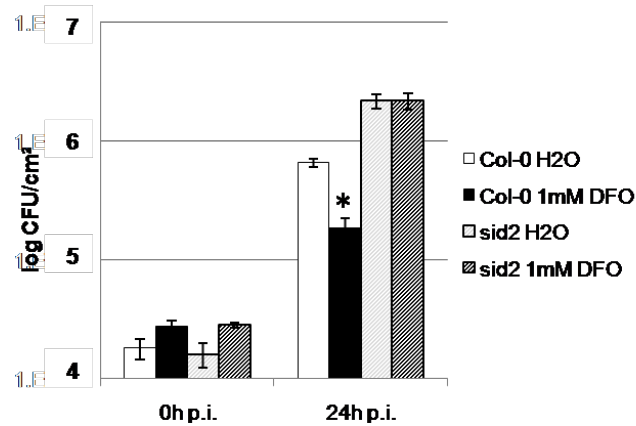
Conclusion

In our model Fig.11, we propose that local perturbation of iron distribution would be due to the chelation of iron by the siderophore thus generating a limited and localized stress response. This stress response would be amplified by metal efflux resulting from an IRT1 dependent uptake. These perturbations of metal homeostasis can cause ROS production, SA and callose accumulation as well as defense gene activation.

Enhanced sensitivity of the *irt1-1* mutant to *D. dadantii* could be due to reduced defenses and is in agreement with our previous results which showed an increased susceptibility in *atnramp3-atnramp4* double mutants correlated with reduced ROS and ferritin accumulation (Segond et al., 2009).

Our work shows that iron scavenging is a new mechanism of immunity activation in plants. It highlights the strong relationship between heavy metal homeostasis and immunity. Further investigation of the signaling network triggered by siderophores will shed light on the mechanistic link between these two processes.

A



B

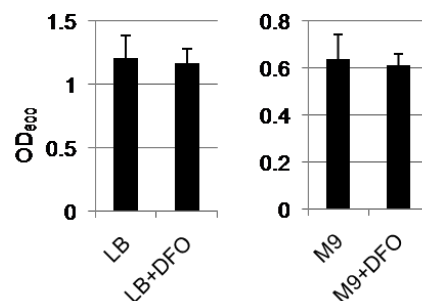


Figure S6: Virulence suppression activity of DFO in *Arabidopsis* requires *SID2*.

(A) Col-0 or *sid2* leaves were infiltrated with 1mM DFO or distilled water as control, followed by inoculation with the pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 24h later. Average bacterial counts per area (\pm SE) are shown at indicated times after bacterial inoculation. Bars=SE. * $P < 0.05$ (Mann and Whitney). (B) Pst DC3000 bacteria were incubated in liquid LB or M9 medium for 24 h with or without 1 mM DFO. Mean optical density at 600 nm of 3 biological replicates (\pm SE) is shown.

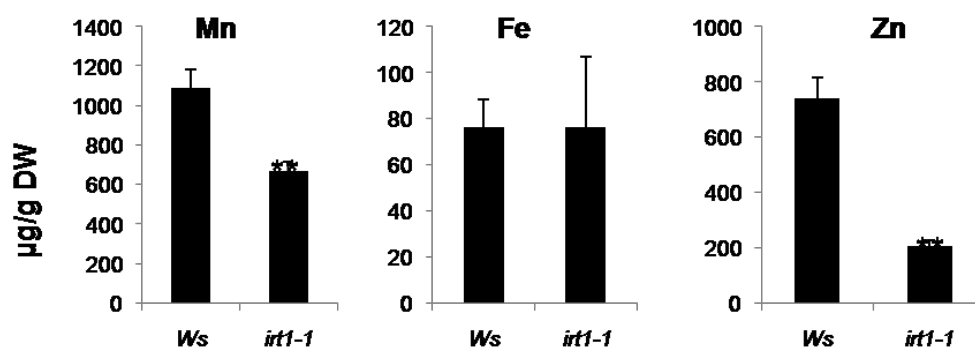


Figure S7: Metal concentration in leaves of *Ws* and *irt1-1* mutant plants. Leaves of five week old hydroponically grown plants were harvested. Metal concentration was determined by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES). Bars=SE. ** $P < 0.01$ (Mann and Whitney). DW: dry weight.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

A. thaliana seeds from the Col-0 and Ws accessions were obtained from the INRA Versailles collection. The *irt1-1* mutant (Vert et al., 2002) was kindly donated by C. Curie and the *sid2* mutant was kindly provided by JP. Métraux (Wildermuth et al., 2002). Hydroponic cultures were conducted as described before (Dellagi et al., 2009). For pathogenicity tests on Ws and *irt1-1* mutant, plants were grown on soil as described before (Fagard et al., 2007).

Chemical preparations for plant treatment

Chrysobactin (CB) synthesis was adapted to the procedure described previously (Lu et al., 1996). Deferrioxamine (deferrioxamine mesylate salt), ferrichrome, ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxy-phenylacetic acid) (EDDHA) and okadaic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Iron chelators were used at a concentration of 1 mM (unless otherwise specified) in distilled water except for EDDHA which was dissolved in 5 mM NaOH. The peptide Flg22 was kindly provided by H. Hirt and used at 100 nM. Okadaic acid was used at 1 μ M. Leaf treatment was performed by infiltration of the solutions in the intercellular leaf space using a syringe without a needle. The volume infiltrated was estimated to be about 50-100 μ L. On each plant, three to four leaves were inoculated; six plants were used in each experiment. Half a leaf was infiltrated for callose and H₂O₂ staining. Only treated leaves were analyzed in this work. Experiments were performed twice to three times with similar results (as indicated in the figure legend). Representative data are shown.

Virulence suppression assays

Plant protection experiments were performed as follows. Leaves were treated with DFO (1 mM) or water as a control. Twenty four hours later, the same leaves were infiltrated using a syringe, without a needle, containing a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 bacterial suspension at a concentration of 5×10^7 CFU ml⁻¹ in sterile water. *In planta* bacterial populations were monitored at indicated time points after bacterial inoculation by tissue grinding followed by serial dilutions plated on King B medium with 60 μ g/mL Rifampicin (King et al., 1954).

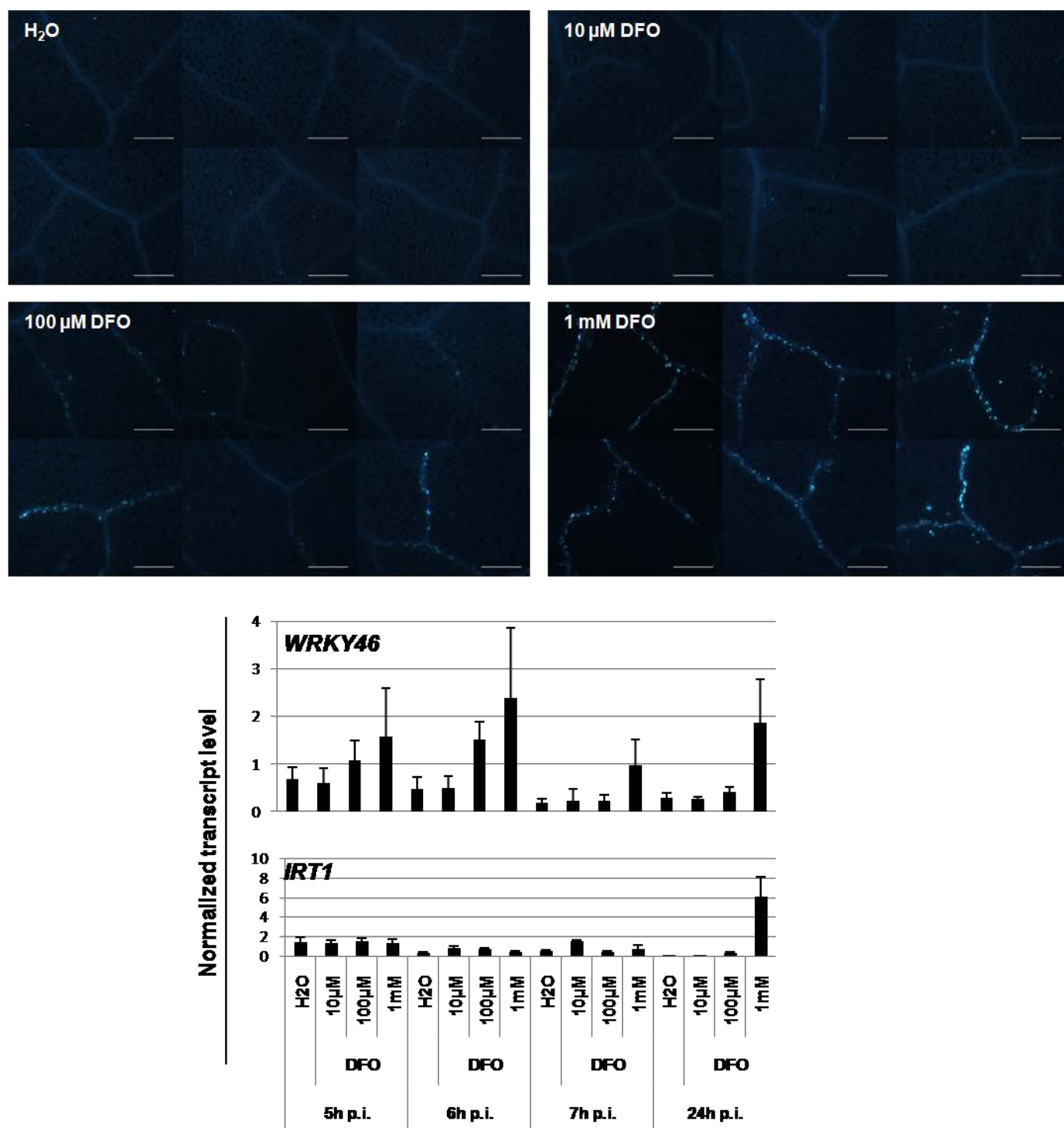


Figure S8: Dose-response effects of DFO in callose deposition and gene expression in Arabidopsis. (A) Leaves of 5 week old hydroponically grown plants were infiltrated with indicated treatments. For each treatment, photographs of callose depositions in 6 different leaves detected with aniline blue staining 8 h p.i. are shown. Bar = 200μm. (B) Leaves of hydroponically grown plants were infiltrated with indicated treatments. Leaves and roots were harvested at indicated times after treatment. The expression of indicated genes was monitored by qRT-PCR from leaves (*WRKY46*) or roots (*IRT1*). Gene expression was normalized against synthetic constitutive gene transcript levels (*ACT*, *EF1α*). Experiments were performed three times with similar results. Representative data are shown. Bars: SD of the normalized ratio.

RNA extraction, RT-PCR and RT-qPCR

Leaves were harvested at indicated time points after treatment then frozen in liquid nitrogen. RT-QPCR were performed as described previously (Kieu *et al.*, 2012). Expression levels were normalized against the constitutive genes actin and adenine-phosphoribosyl transferase-1 and provided similar results. Data with actin are represented. Primer sequences are available in Table S5.

Monitoring salicylic acid and jasmonic acid amounts

Freeze-dried samples were homogenized in powder and weighed (50 mg for leaves and 20 mg for roots) and extracted with 3 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1 v:v:v) containing 20ng stable isotope labelled internal standards : [4-²H] salicylic acid (OlchemIm, Olomouc, Czech Republic) and [5-²H] jasmonic acid (CDN Isotopes CIL Cluzeau) Sainte Foy la Grande France. The extract was vigorously shaken 30 s, sonicated 1 min at 25 Hz, shaken 10 min at room temperature and then centrifuged. The supernatants were collected, and the pellets were extracted with 1 mL of the same extraction solution. Following centrifugation, the two supernatants were pooled and dried. The dry extract was dissolved in 140 µL of acetonitrile/water (50/50; v/v), filtered, and submitted to analysis by HPLC-electrospray-MSMS (HPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on an HPLC (Alliance; Waters, Milford, MA, USA) equipped with a reverse-phase column (Uptisphere C18 HDO, 150*2.1 mm, Interchim, Montluçon, France) using a flow rate of 0.15 mL.min⁻¹ with a binary gradient: (A) acetic acid 0.1% (v/v) and (B) acetonitrile. The solvent gradient was programmed as follows: 0–5 min 20% A, 5–15 min 50% A, 15–30 min 100% B, 30–42 min 20%. The analyses were performed on a Waters Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer (Waters) operating in a Multiple Reaction Monitoring (MRM) scanning mode. The transition used for MRM quantification of the different hormones in negative mode are shown in Table S6. The amount of JA was expressed as a ratio of peak areas (209>62 / 214>62) per dry weight, due to impurities contained in the D5-JA standard.

Microarray experiments

Microarray analysis was performed using the CATMA database version 5 arrays containing 34648 probes corresponding to 26,173 annotated genes from Arabidopsis (Sclep *et al.*, 2007) plus 1259 probes corresponding to 521 microRNA genes or SiRNA genes (Jay *et al.*, 2010), information available at <http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml>. A regular protocol based on technical repeats of two independent biological replicates produced from pooled material from six independent plants for each point, was adopted in this study. For each biological repeat and each point, RNA samples were extracted from leaves or roots at indicated post-infiltration times. For each comparison, one technical replication with fluorochrome reversal was performed for each biological replicate (*i.e.* four hybridizations per comparison). The labeling of complementary RNAs with Cy3-

dUTP or Cy5-dUTP (Perkin-Elmer-NEN Life Science Products), the hybridization to the slides and the scanning were performed as described previously (Lurin et al., 2004).

Data deposition

Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), accession no. GSE18976 and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: AU08-04_DFO) according to the “Minimum Information about a Microarray Experiment” standards. Additional information about statistical data analysis is available in Supplementary methods 1.

Hydrogen peroxide detection and callose deposition monitoring

Hydrogen peroxide staining and callose deposition monitoring and quantifications were performed as described previously (Kieu *et al.*, 2012).

Symptoms scoring

Pathogenicity of the enterobacterium *D. dadantii* 3937 was assayed on 5 week old soil grown seedlings and symptom scoring was performed as described previously (Fagard et al., 2007). Based on the therein described disease scoring index, mean scores were calculated at each date. Experiments were realized three times with similar results.

Metal concentrations analysis

Roots were desorbed for 10 min in ice cold buffer containing 5 mM CaCl₂ and 1 mM MES pH 5.7 and then briefly rinsed with ultrapure water. The dry weight (DW) of the samples was measured after drying at 60°C for 3 d. The dried samples were digested in 2 mL of 70 % nitric acid in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 80°C for 1 hr, then 100°C for 1 hr and 120°C for 2 hr. After dilution in trace-metal-free water, the metal concentration of the samples was determined by atomic absorption spectrometry using an AA240FS flame spectrometer (Agilent, USA).

Perls' DAB staining of tissues

Samples were fixed for 3 h in a solution consisting of 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.05 M piperazine-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid), (PIPES) buffer, pH 7.3, under intermittent vacuum. They were washed four times in the same buffer and were dehydrated in a graded ethanol series before embedding in a LR White resin (The London Resin Co., Hampshire, U.K.). For LM, transverse semi-thin (0.5 µm) sections were cut with a diamond knife (Diatome histo, Bienne, Switzerland). Perls' DAB-H₂O₂ staining was performed on these sections as described in Roschztardt

(2010). They were then observed with a Zeiss Axiophot light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Supplementary methods 1: Statistical Analysis of Microarray Data

Experiments were designed together with the statistics group of the Unité de Recherche en Génomique Végétale. The methods are available in the R package Anapuce; (<http://cran.r-project.org/web/packages/anapuce/index.html>). The normalization and statistical analysis were based on two dye swaps (i.e. four arrays) per comparison (Gagnot *et al.*, 2008). First, one normalization without background subtraction per array is performed to remove systematic biases. Then, a global intensity independent normalization is performed using the lowess procedures (Yang and Thorne, 2003) to correct the dye bias. Finally, for each block, the log-ratio median calculated over the values for the entire block is subtracted from each individual log ratio value to correct effects on each block, as well as print-tip, washing and/or drying effects. To determine differentially expressed genes from a dye-swap, a paired t-test is performed on the log2 ratios, with a common variance for all the genes (H homoscedasticity), leading to a robust estimation of the variance and a high power of the test. Spots with an extreme variance or genes for which only one observation is available are excluded. Then, the raw P-values are adjusted by the Bonferroni method, which controls the Family Wise Error Rate (Ge *et al.*, 2003). Genes with a Bonferroni P-value < 0.05 were considered differentially expressed, as described in (Gagnot *et al.*, 2008).

Gagnot S, Tamby J-P, Martin-Magniette M-L, Bitton F, Taconnat L, Balzergue S, Aubourg S, Renou J-P, Lecharny A, Brunaud V. 2008. CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. Nucleic Acids Research 36: D986-D990.

Ge YC, Dudoit S, Speed TP. 2003. Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. Test 12(1): 1-77.

Yang YH and Thorne N. 2003. Normalization for two-color cDNA microarray data. In IMS lecture notes-monograph series. DR Goldstein. Sci. Stat. 40, 403-418.

Acknowledgments

We are grateful to Catherine Curie (CNRS Montpellier) for providing the *irt1-1* mutant and Colin R. Tinsley (AgroParisTech, Paris) for correcting the manuscript.

Author contributions: AD designed research and wrote the manuscript; AA, NWG, MR performed experiments; GM, SB analyzed hormones; LST, JPR performed microarray experiments; DD, DJ, NR synthesized chrysobactin; ST performed metal analysis; DE contributed writing the manuscript.

References

- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F** (2003) Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Reviews* **27**: 215-237
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F** (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for Arabidopsis AtFer1 ferritin gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 23579-23588
- Bakker PAHM, Pieterse CMJ, van Loon LC** (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239-243
- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conejero G, Curie C, Friml J, Vert G** (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the Iron-Regulated Transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**
- Benning C** (2009) Mechanisms of Lipid Transport Involved in Organelle Biogenesis in Plant Cells. *In Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 25. Annual Reviews, Palo Alto, pp 71-91
- Bent AF, Mackey D** (2007) Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 399-436
- Briat J-F, Curie C, Gaymard F** (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 276-282
- Briat J-F, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F** (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany* **105**: 811-822
- Chang YC, Yamamoto Y, Matsumoto H** (1999) Enhancement of callose production by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco (*Nicotiana tabacum*) cells. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**: 337-347
- Choi E-Y, Lee S, Oh H-M, Kim Y-D, Choi E-J, Kim S-H, Kim S-W, Choi S-C, Jun C-D** (2007) Involvement of protein kinase C delta in iron chelator-induced IL-8 production in human intestinal epithelial cells. *Life Sciences* **80**: 436-445
- Choi EY, Kim EC, Oh HM, Kim S, Lee HJ, Cho EY, Yoon KH, Kim EA, Han WC, Choi SC, Hwang JY, Park C, Oh BS, Kim Y, Kimm KC, Park KI, Chung HT, Jun CD** (2004) Iron chelator triggers inflammatory signals in human intestinal epithelial cells: involvement of p38 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Journal of Immunology* **172**: 7069-7077
- Choi EY, Park ZY, Choi EJ, Oh HM, Lee S, Choi SC, Lee KM, Im SH, Chun JS, Jun CD** (2007) Transcriptional regulation of IL-8 by iron chelator in human epithelial cells is independent from NF-kappa B but involves ERK1/2-and p38 kinase-dependent activation of AP-1. *Journal of Cellular Biochemistry* **102**: 1442-1457
- Colangelo EP, Gueriot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400-3412
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**: 1-11
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P** (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* **351**: 95-105
- De Vleeschauwer D, Hofte M** (2009) Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *Plant Innate Immunity* **51**: 223-281
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat JF, Gaymard F, Expert D** (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant Journal* **43**: 262-272
- Dellagi A, Segond D, Rigault M, Fagard M, Simon C, Saindrenan P, Expert D** (2009) Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiology* **150**: 1687-1696
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J** (2009) Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in Arabidopsis Seedlings (vol 1, pg 425, 2008). *Molecular Plant* **2**: 838-838
- Eide D, Broderius M, Fett J, Gueriot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5624-5628
- Expert D** (1999) Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 307-334

- Fagard M, Dellagi A, Roux C, Perino C, Rigault M, Boucher V, Shevchik VE, Expert D** (2007) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 794-805
- Gaymard F, Boucherez J, Briat JF** (1996) Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochemical Journal* **318**: 67-73
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **18**: 277-284
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG** (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 149-187
- Hu Y, Dong Q, Yu D** (2012) *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Science* **185**
- Jakoby M, Wang HY, Reidt W, Weisshaar B, Bauer P** (2004) FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters* **577**
- Jay F, Renou J-P, Voynet O, Navarro L** (2010) Biotic stress-associated microRNAs: identification, detection, regulation, and functional analysis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) **592**: 183-202
- Jomova K, Valko M** (2011) Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Current Pharmaceutical Design* **17**: 3460-3473
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Kartusch R** (2003) On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma* **220**: 219-225
- Kieu NP, Aznar A, Segond D, Rigault M, Simond-Côte E, Kunz C, Soulie MC, Expert D, Dellagi A** (2012) Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol.* **13**:816-827.
- Kim SA, Guerinot ML** (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Febs Letters* **581**
- King EO, Ward MK, Raney DE** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **44**
- Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P** (2009) The Analysis of *Arabidopsis* Nicotianamine Synthase Mutants Reveals Functions for Nicotianamine in Seed Iron Loading and Iron Deficiency Responses. *Plant Physiology* **150**
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* **40**: 37-44
- Lan P, Li W, Wen T-N, Schmidt W** (2012) Quantitative Phosphoproteome Profiling of Iron-Deficient *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiology* **159**
- Lee HJ, Choi SC, Choi EY, Lee MH, Seo GS, Kim EC, Yang BJ, Lee MS, Shine YI, Park KI, Jun CD** (2005) Iron chelator induces MIP-3 α /CCL20 in human intestinal epithelial cells: implication for triggering mucosal adaptive immunity. *Experimental and Molecular Medicine* **37**: 297-310
- Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker P, Briat JF** (2009) Role of Iron in Plant-Microbe Interactions. *Plant Innate Immunity* **51**: 491-549
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant Journal* **46**
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN** (2010) The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell* **22**
- Lu C, Buyer JS, Okonya JF, Miller MJ** (1996) Synthesis of optically pure chrysobactin and immunoassay development. *Biometals* **9**: 377-383
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J** (2011) Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 183-193
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Tacconnat L, Small I** (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**: 2089-2103
- Mackintosh C, Cohen P** (1989) identification of high-levels of type-1 and type-2a protein phosphatases in higher-plants. *Biochemical Journal* **262**: 335-339
- McCann HC, Nahal H, Thakur S, Guttman DS** (2012) Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 4215-4220

- Mur LAJ, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Hebelstrup KH** (2012) Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *Journal of Experimental Botany* **63**
- Neema C, Laulhere JP, Expert D** (1993) iron-deficiency induced by chrysobactin in saintpaulia leaves inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiology* **102**: 967-973
- Nunez MT, Urrutia P, Mena N, Aguirre P, Tapia V, Salazar J** (2012) Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals* **25**: 761-776
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249-266
- Persmark M, Expert D, Neilands JB** (1989) Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 3187-3193
- Pierre JL, Fontecave M** (1999) Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals* **12**: 195-199
- Pirselova B, Matusikova I** (2013) Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 635-644
- Ran LX, Li ZN, Wu GJ, van Loon LC, Bakker P** (2005) Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology* **113**: 59-70
- Ravet K, Touraine B, Kim SA, Cellier F, Thomine S, Guerinot ML, Briat JF, Gaymard F** (2009) Post-Translational Regulation of AtFER2 Ferritin in Response to Intracellular Iron Trafficking during Fruit Development in Arabidopsis. *Molecular Plant* **2**: 1095-1106
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697
- Roschttardtz H, Conejero G, Curie C, Mari S** (2010) Straightforward histochemical staining of Fe by the adaptation of an old-school technique: identification of the endodermal vacuole as the site of Fe storage in Arabidopsis embryos. *Plant signaling & behavior* **5**
- Roschttardtz H, Grillet L, Isaure MP, Conejero G, Ortega R, Curie C, Mari S** (2011) Plant Cell Nucleolus as a Hot Spot for Iron. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 27863-27866
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkotter M, Mewes HW** (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* **32**: 5539-5545
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ** (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247-258
- Sclep G, Allemeersch J, Liechti R, De Meyer B, Beynon J, Bhalerao R, Moreau Y, Nietfeld W, Renou J-P, Reymond P, Kuiper MTR, Hilson P** (2007) CATMA, a comprehensive genome-scale resource for silencing and transcript profiling of Arabidopsis genes. *Bmc Bioinformatics* **8**
- Segond D, Dellagi A, Lanquar V, Rigault M, Patrit O, Thomine S, Expert D** (2009) NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant Journal* **58**: 195-207
- Sivitz AB, Hermand V, Curie C, Vert G** (2012) Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 Control Iron Homeostasis via a FIT-Independent Pathway. *PloS one* **7**
- Smits THM, Duffy B** (2011) Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. *Archives of Microbiology* **193**: 693-699
- Torres MA** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* **138**: 414-429
- Ueki S, Citovsky V** (2002) The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. *Nature Cell Biology* **4**: 478-485
- Ueki S, Citovsky V** (2005) Identification of an interactor of cadmium ion-induced glycine-rich protein involved in regulation of callose levels in plant vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12089-12094
- van Loon LC, Bakker PAHM, van der Heijdt WHW, Wendehenne D, Pugin A** (2008) Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1609-1621
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2002) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence (vol 414, pg 562, 2001). *Nature* **417**: 571-571
- Winkelmann G** (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* **20**: 379-392

Yuan YX, Wu HL, Wang N, Li J, Zhao WN, Du J, Wang DW, Ling HQ (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Research* **18**: 385-397

CHAPITRE III

***MPK11*: UN GENE IMPLIQUE DANS LES REPONSES AU STRESS BIOTIQUE ET A LA CARENCE EN FER**

CHAPITRE III : *MPK11*: UN GENE IMPLIQUE DANS LES REPONSES AU STRESS BIOTIQUE ET A LA CARENCE EN FER

Préambule

Afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la mise en place des processus physiologiques en réponse au traitement sidérophore, nous avons analysé les gènes différentiellement exprimé en réponse à DFO.

Parmi ces gènes, nous nous sommes particulièrement intéressés à ceux dont l'expression était induite uniquement à 7h p.i. et qui codent une fonction de signalisation. Dans cette catégorie de gènes candidats, à l'aide des bases de données publiques nous avons sélectionné ceux dont l'expression est induite en réponse au stress biotique et en réponse à la carence en fer.

Parmi les gènes surexprimés en réponse à DFO, beaucoup de gènes codaient des fonctions de signalisation. L'expression de huit gènes codant des MAPK est induite à 7h p.i. uniquement. Nous avons donc pensé que les MAPK jouent un rôle dans la signalisation précoce. Dans les huit gènes *MAPK*, seul le gène *MPK11* est peu étudié et est transcriptionnellement activé suite à un stress biotique et en réponse à la carence en fer.

Le gène *MPK11*, qui code la protéine MPK11, a été retenu comme gène candidat et les phénotypes du mutant *mpk11* en réponse au sidérophore et à la carence en fer ont été analysés. Une stratégie de complémentation du mutant *mpk11* a été entreprise en collaboration avec Jean Colcombet (URGV, Evry).

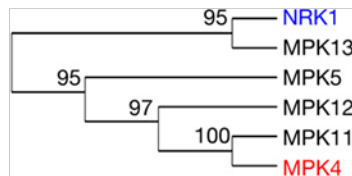


Figure 1: Arbre phylogénétique de la protéine MPK NRK1 du tabac et les cinq protéines appartenant à la famille du groupe B des MPK.

Kosetsu et al., 2010.

Tableau 1: Les 100 analyses transcriptomiques dans lesquelles le gène **MPK11** est le plus exprimé par la condition testée.

L'outil Perturbation de la base de données Genevestigator a été utilisé pour établir la liste des 100 expériences dans lesquelles l'expression du gène MPK11 est la plus fortement induite, entre la condition testée et la condition contrôle. (www.genevestigator.com)

Nom et condition de l'expérimentation	Log2-ratio	Nom et condition de l'expérimentation	Log2-ratio
shift 28°C to 19°C study 2 (35S:RPS4-HS) / 28°C (35S:RPS4-HS)	6.767	salicylic acid study 7 (npr1-1 sni1) / solvent treated whole plant samples (npr1-1 sni1)	3.558
shift 28°C to 19°C study 2 (35S:RPS4-HS rrs1-11) / 28°C (35S:RPS4-HS rrs1-11)	6.354	salicylic acid study 11 (JC66) / mock treated seedling samples (JC66)	3.554
shift 28°C to 19°C study 3 (35S:RPS4-HS) / 28°C (35S:RPS4-HS)	6.236	EF-Tu (elf26) (30min) / untreated whole plant samples (Ler-0)	3.554
shift 28°C to 19°C study 3 (35S:RPS4-HS rrs1-11) / 28°C (35S:RPS4-HS rrs1-11)	5.992	MAA + FLG22 (1h) / untreated leaf disc samples (Col-0)	3.535
EF-Tu (elf26) (60min) / untreated whole plant samples (Ler-0)	5.393	Bay-0 parent / Fei-0	3.512
P. syringae pv. tomato study 6 (pad4-5) / mock-inoculated leaf samples (pad4-5)	5.371	FLG22 + GA (2h) / untreated leaf disc samples (Ler)	3.473
P. syringae pv. tomato study 6 (Ws-0) / mock-inoculated leaf samples (Ws-0)	5.346	cpr5:scd1 / Col-0	3.465
FLG22 study 6 (Ler) / FLG22 study 8 (1h)	5.311	P. syringae pv. maculicola (Col-0) / mock treated leaf samples (Col-0)	3.455
oligomycin (4h) / solvent treated seedling culture samples (4h)	5.242	X. campestris pv. campestris study 2 (Ws-4) / untreated leaf samples (Ws-4)	3.455
P. syringae pv. tomato study 6 (eds1-1) / mock-inoculated leaf samples (eds1-1)	5.191	FLG22 study 7 (Ler) / FLG22 study 8 (2h)	3.433
EF-Tu (elf18) (60min) / untreated whole plant samples (fts2-17)	5.125	P. syringae pv. tomato study 8 (DC3000) / mock inoculated leaf samples	3.405
cycloheximide / mock treated seedlings	5.07	Umrkch-1/Umrkch-3 / miRNA-Umrkch-3	3.4
FLG22 + GA (1h) / untreated leaf disc samples (Ler)	4.9	FLG22 study 4 (35S:AFB1) / untreated leaf disc samples (35S:AFB1)	3.398
FLG22 study 6 (penta) / untreated leaf disc samples (penta)	4.789	DFFM + ABA (Col-0) / solvent treated seedling samples (Col-0)	3.376
benzothiadiazole study 3 (mkk2) / untreated (mkk2) plant samples	4.688	AWRKY63 OE1 / Col-0	3.364
FLG22 study 6 (Ler) / untreated leaf disc samples (Ler)	4.671	cordycepin (3h) / untreated cell samples	3.325
antimycin A study 2 (rao2-1) / mock treated shoot samples (rao2-1)	4.611	FLG22 study 2 (1h) / H2O treated Col-0 seedlings (1h)	3.276
antimycin A study 2 (anac017-1) / mock treated shoot samples (anac017-1)	4.57	FLG22 study 2 (3h) / H2O treated Col-0 seedlings (3h)	3.269
5-AC / solvent treated seedling samples (Ws)	4.499	salicylic acid study 11 (dsr1) / mock treated seedling samples (dsr1)	3.263
EF-Tu (elf18) (30min) / untreated whole plant samples (fts2-17)	4.409	P. cucumerina study 2 (agb1-1) / mock inoculated rosette samples (agb1-1)	3.258
P. parasitica (6h) / non-infected root samples (Col-0)	4.367	drought study 7 (srk2cf) / untreated plant samples (srk2cf)	3.257
OMP (4h) / solvent treated root culture samples (4h)	4.35	cold study 2 (late) / untreated root samples (late)	3.25
mkk1/mkk2 / Col-0	4.341	P. syringae pv. tomato study 12 (atgcnor1-3) / untreated leaf tissue samples (atgcnor1-3)	3.232
UV unfiltered max-310nm (6h) / seedlings irradiated with 327nm cut-off (6h)	4.279	EF-Tu (elf18) study 4 (ein2-1) / mock treated seedling samples (ein2-1)	3.211
P. parasitica (10.5h) / non-infected root samples (Col-0)	4.276	met1-1 / Ws	3.167
EF-Tu (elf18) study 4 (Col-0) / mock treated seedling samples (Col-0)	4.259	shift 28°C to 19°C (35S:RPS4-HS) / 28°C (35S:RPS4-HS)	3.158
P. syringae pv. tomato study 12 (sid2) / untreated leaf tissue samples (sid2)	4.253	EF-Tu (elf18) study 3 (ein2-1) / mock treated seedling samples (ein2-1)	3.133
flu/over-tAPK / Col-0	4.203	DFFM (Col-0) / solvent treated seedling samples (Col-0)	3.087
antimycin A study 2 (AOX1a1UC) / mock treated shoot samples (AOX1a1UC)	4.158	FLG22 study 7 (penta) / untreated leaf disc samples (penta)	3.077
P. parasitica (2.5h) / non-infected root samples (Col-0)	4.107	chitin / mock treated seedlings	3.06
Pep2 (bak1-3) / mock treated seedling samples (bak1-3)	4.053	drought study 16 (srk2dei) / mock treated srk2dei whole plant samples	3.048
antimycin A (AOX1a1UC) / mock treated shoot samples (AOX1a1UC)	3.975	benzothiadiazole study 3 (Col-0) / untreated (Col-0) plant samples	3.044
X. campestris pv. campestris study 2 (AIMYB30-or-20A) / untreated leaf samples (AIMYB30-or-20A)	3.898	SQ-8 / Ws-2	3.009
P. syringae pv. tomato study 9 (DC3118 Cor-) / mock inoculated leaf samples	3.859	H. arabidopsis study 5 (rpp4) / untreated seedling samples (rpp4)	2.956
antimycin A (rao1-2) / mock treated shoot samples (rao1-2)	3.852	drought study 12 (SQ-8) / mock treated SQ-8 rosette leaf samples	2.953
Pep2 (Col-0) / mock treated seedling samples (Col-0)	3.834	P. syringae pv. tomato study 7 (Ws-0) / mock-inoculated leaf samples (Ws-0)	2.933
P. parasitica (30h) / non-infected root samples (Col-0)	3.833	drought study 7 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	2.923
B. graminis (ataf1-1) / non-infected rosette leaf samples	3.829	fencloirum (4h) / solvent treated root culture samples (4h)	2.916
flu / Col-0	3.824	syringolin study 3 (late) / solvent treated leaf samples (Col-0; late)	2.861
cordycepin (1h) / untreated cell samples	3.809	UV unfiltered max-310nm (1h) / seedlings irradiated with 327nm cut-off (1h)	2.84
syringolin study 2 / solvent treated leaf samples (syl_404_b2)	3.799	iron deficiency study 13 (bhlh1.00 bhlh1.01) / untreated bhlh1.00 bhlh1.01 shoot samples	2.823
FLG22 study 4 (35S:miR393) / untreated leaf disc samples (35S:miR393)	3.79	aba1-1 / Ler-0	2.773
benzothiadiazole study 3 (mkk1) / untreated (mkk1) plant samples	3.725	csn5 (csn5a-2 csn5b) / Col-0	2.771
Pep2 (ein2-1) / mock treated seedling samples (ein2-1)	3.711	ozone study 2 (agb1-2 gpa1-4) / fresh air treated leaf samples (agb1-2 gpa1-4)	2.768
FLG22 study 4 (Col-0) / untreated leaf disc samples (Col-0)	3.696	drought study 6 (srk2cf) / untreated plant samples (srk2cf)	2.757
ss2-1 / Col-0	3.692	P. syringae pv. tomato study 8 (DC3118 Cor-) / mock inoculated leaf samples	2.744
antimycin A (rao1-1) / mock treated shoot samples (rao1-1)	3.688	drought study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	2.735
ozone / air treated seedlings	3.616	P. syringae pv. phaseolicola (6h) / P. syringae pv. tomato study 2 (DC3000 hrc-)	2.719
imidacloprid (4d) / mock treated Col-0 rosette leaf samples (4d)	3.588	UV-B (tt4(C1)) / shift LD to CL (tt4(C1))	2.716
shift 28°C to 19°C (35S:RPS4-HS rrs1-11) / 28°C (35S:RPS4-HS rrs1-11)	3.566	Pep2 study 2 (bak1-3) / mock treated seedling samples (bak1-3)	2.707

Introduction

Les protéines Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) ont été identifiées chez tous les organismes eucaryotes étudiés (Meng and Zhang, 2013). Les MAPK sont des protéines de signalisation conservées, organisées en modules conduisant à une cascade de phosphorylation, qui sont particulièrement développés chez les plantes. Les MAPK assurent la transduction, l'intégration et l'amplification de signaux extérieurs aboutissant à l'activation des réponses de la cellule au stimulus considéré. Parmi ces signaux, on trouve des signaux de stress biotique, comme l'infection par des microorganismes pathogènes ou des blessures résultant de l'action d'herbivores, mais également des signaux de stress abiotiques comme le froid, la sécheresse ou encore le stress mécanique (Sinha et al., 2011; Meng and Zhang, 2013).

Le module MAPK minimal est constitué d'au moins 3 protéines MAP kinases qui sont une protéine MAP kinase kinase kinase (MAP3K), une protéine MAP kinase kinase (MAP2K) puis une protéine MAP kinase (MAPK). Un niveau de régulation supérieur du module peut s'ajouter en raison de la présence de protéines MAP kinase kinase kinase kinase (MAP4K). Chaque protéine MAP Kinase est responsable de la phosphorylation de la MAP kinase d'ordre inférieur qui lui succède directement (Colcombet and Hirt, 2008). Les MAP3K sont des protéines de type sérine/thréonine (S/T) kinases qui phosphorylent les acides aminés du motif S/T-X₃₋₅-S/T de la boucle d'activation de la MAP2K du module. Les MAPK, qui sont des S/T kinases, sont activées *via* deux phosphorylations sur le motif T-X-Y de la boucle d'activation, et ce par les protéines MAP2K. Une fois activées, les MAPK assurent la phosphorylation d'un grand nombre de cibles, comprenant notamment d'autres protéines kinases ou des facteurs de transcription. Dans le génome d'*A. thaliana*, 80 gènes codant des protéines MAP3K, 10 gènes codant des protéines MAP2K et 20 gènes codant des protéines MAPK ont été identifiés (Colcombet and Hirt, 2008).

Les 80 protéines MAP3K sont réparties en 3 groupes principaux : le groupe des protéines MAPK/ERK kinase kinase (MEKK) qui est fonctionnel *in planta*, et les groupes des protéines Raf-like et ZIK-like dont la fonctionnalité n'a pas été démontrée chez des organismes végétaux (Colcombet and Hirt, 2008). Les MAP3K permettent également l'organisation du module de signalisation en assurant des fonctions de protéine d'échafaudage. Les protéines MAPK et MAP2K forment une famille de kinases hétérologues divisée en 4 groupes de A à D (Ichimura et al., 2002). Le gène MPK11 appartient au groupe B, qui comporte également les gènes codant les protéines MPK4, MPK5, MPK12 et MPK13 impliquées dans la division cellulaire et la réponse aux stress environnementaux (Figure 1).

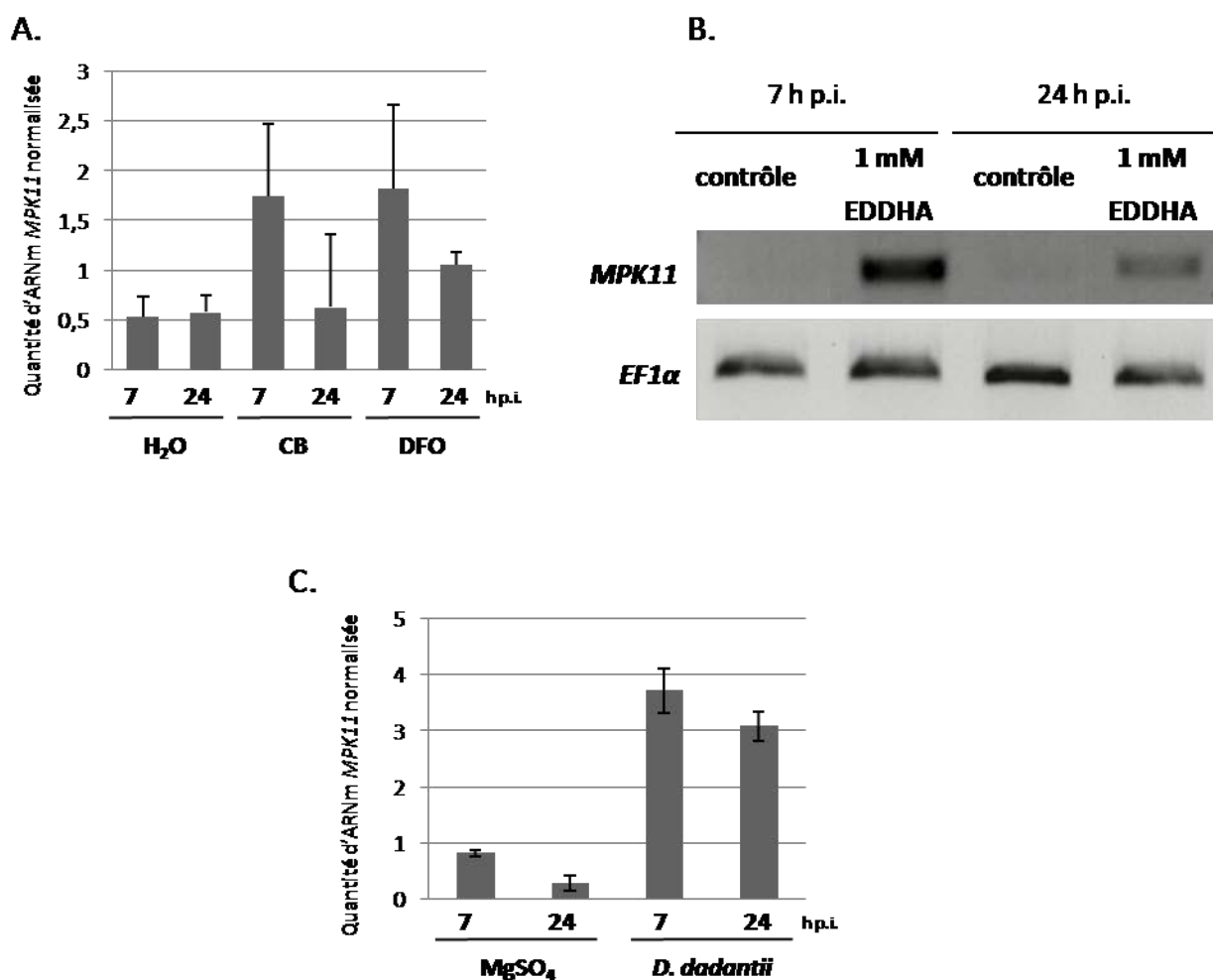


Figure .2: Les transcrits *MPK11* sont accumulés en réponse à la chélation du fer et en réponse à l'infection par *D. dadantii*.

- A.** Les feuilles de Col-0 sont infiltrées avec de l'eau, 1mM chrysobactine (CB) ou 1mM desferrioxamine (DFO). Les feuilles sont prélevées à 7h et 24h post-infiltration (p.i.). L'expression du gène *MPK11* est évaluée par RT-qPCR à partir des ADNc extraits des feuilles infiltrées. L'expression de *MPK11* est normalisée contre le niveau d'expression d'un gène synthétique (*ACT*, *EF1α*).
- B.** Les feuilles de Col-0 sont infiltrées avec 5mM NaOH (contrôle) ou 1mM EDDHA. Les feuilles sont prélevées à 7h et 24h post-infiltration (p.i.). L'expression du gène *MPK11* est évaluée par RT-PCR point final à partir des ADNc extraits des feuilles infiltrées. Le gène *EF1α* est utilisé comme contrôle.
- C.** Les feuilles de Col-0 sont infiltrées avec 10mM MgSO₄ ou une suspension bactérienne de *D. dadantii* (10⁷cfu/ml). Les feuilles sont prélevées à 7h et 24h post-infiltration (p.i.). L'expression du gène *MPK11* est évaluée par RT-qPCR à partir des ADNc extraits des feuilles infiltrées. L'expression de *MPK11* est normalisée contre le niveau d'expression d'un gène synthétique (*ACT*, *EF1α*).

Le couple d'amorces c1 est utilisé pour la détection de *MPK11*. Les expériences ont été réalisées trois fois avec des résultats similaires; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. Pour chaque point, 6 plantes sont utilisées et 3 feuilles par plantes sont infiltrées.

En effet, comme son plus proche homologue MPK4, Kosetsu *et al.* ont montré que MPK11 participe à la cytokinèse (Kosetsu *et al.*, 2010). Bien que le simple mutant *mpk11* ne présente pas de phénotype particulier en comparaison avec la plante sauvage Col-0, le phénotype de nanisme observé chez le mutant *mpk4* est très fortement aggravé chez le double mutant *mpk4 mpk11*. De même, bien que la cytokinèse ne semble pas être affectée chez le mutant *mpk11*, les anomalies de divisions cellulaires sont plus fréquentes chez le double mutant *mpk4 mpk11* que chez le simple mutant *mpk4* (Kosetsu *et al.*, 2010).

D'autre part, il a été montré que les traitements avec les MAMP flg22, elf18 et ch8 (un dérivé de la chitine) provoquent une accumulation transitoire des transcrits *MPK11* (Bethke *et al.*, 2012; Eschen-Lippold *et al.*, 2012). En plus de l'activation transcriptionnelle, l'expression de la fusion traductionnelle entre MPK11 et l'haemagglutinine (HA) dans des protoplastes a mis en évidence l'induction de l'activité MAP kinase de la protéine MPK11 en réponse à flg22, elf18 et ch8 (Bethke *et al.*, 2012; Eschen-Lippold *et al.*, 2012). En réponse au traitement flg22, le mutant *mpk11* conserve un niveau de SA équivalent à celui de Col-0, contrairement au mutant *mpk4* dont l'accumulation de SA est constitutive (Bethke *et al.*, 2012). De même, le phénotype d'arrêt de croissance racinaire des mutants *mpk4* et *mpk11* en réponse à flg22 est opposé. En comparaison avec les plantes sauvages, alors que la croissance racinaire de *mpk4* est favorisée en présence de flg22, la croissance racinaire du mutant *mpk11* est inhibée. Ces résultats indiquent que MPK11 est une protéine MAP kinase de réponse aux MAMP. Malgré son rôle dans la réponse aux MAMP, le mutant *mpk11* présente le même degré de sensibilité que la plante sauvage lors de l'infection par les agents pathogènes *A. brassicicola*, *B. cinerea*, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et *P. maculicola* (Bethke *et al.*, 2012).

Dans la base de données Genevestigator, le profil d'expression du gène *MPK11* est en accord avec ces résultats. Dans le Tableau 1 sont représentées les 100 expériences d'analyses transcriptomiques recensées par Genevestigator pour lesquelles l'expression du gène *MPK11* est la plus induite par la condition testée par rapport à la condition contrôle. De manière intéressante, parmi ces expériences, qui sont majoritairement des expériences relatives aux stress biotiques, apparaît une analyse comparative des feuilles du double mutant *bhlh100bhlh101*, affecté dans la réponse à la carence en fer, et de Col-0 en condition de carence ferrique. L'expression de *MPK11* est activée dans le mutant *bhlh100bhlh101* carencé en fer par rapport au mutant non carencé. Sur la base de nos résultats d'analyse transcriptomique de réponse à DFO, le gène *MPK11* fait partie des gènes dont l'expression est induite précocement dans les feuilles (Aznar *et al.*, 2014). Du fait que le gène *MPK11* code une protéine MAP kinase, impliquée dans la signalisation des MAMP, et que d'après des données transcriptomiques ce gène est impliqué

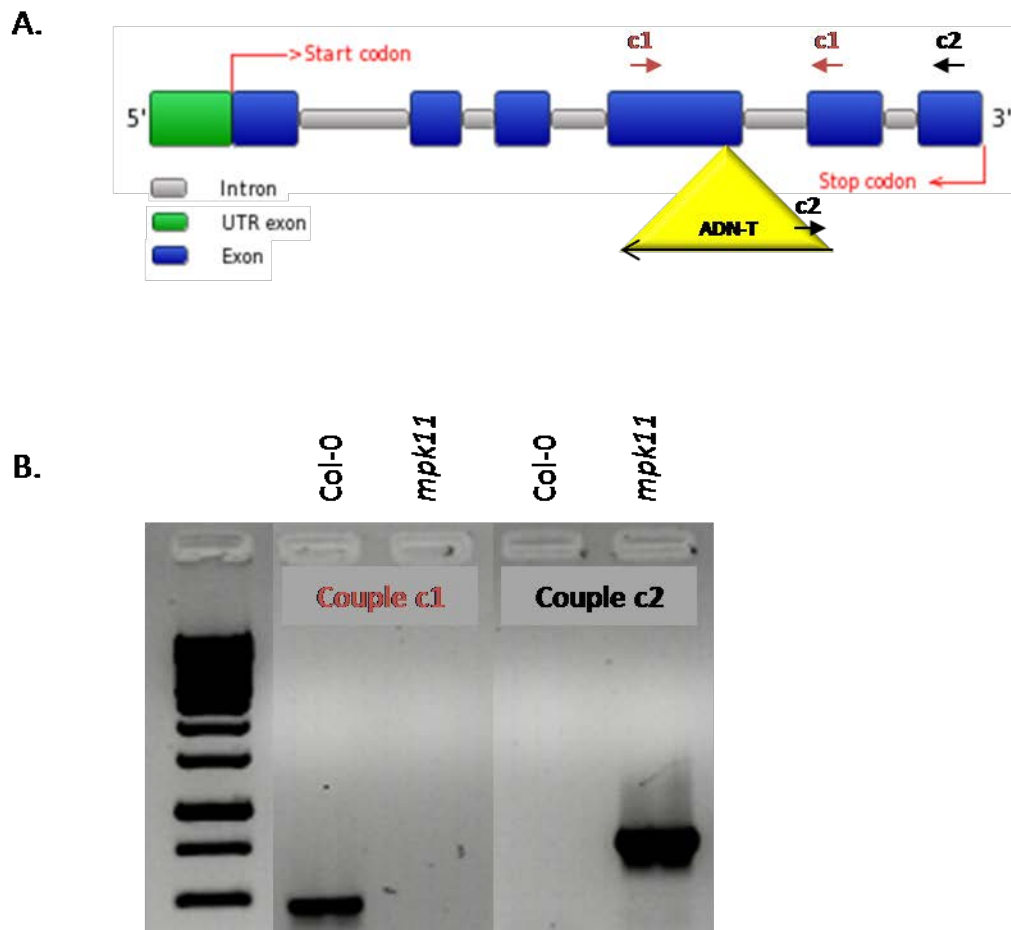


Figure 3: Site d'insertion de l'ADN-T chez le mutant *mpk11*.

- A.** Représentation schématique de la séquence du gène *MPK11* (At1g01560) et de l'insertion ADN-T chez le mutant *mpk11*. l'ADN-T est inséré dans le quatrième exon. La localisation des couples d'amorces utilisées lors du génotypage sont représentés (c1 et c2).
- B.** Résultats d'amplification par PCR de la séquence sauvage du gène *MPK11* (couple1) ou de l'insertion de l'ADN-T dans la séquence du gène *MPK11*.

Adapté d'après <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/genes/view/AT1G01560>

dans la réponse aux stress biotiques et à la carence en fer, nous avons choisi d'étudier le rôle potentiel de *MPK11* dans la signalisation déclenchée par les sidérophores.

Résultats

L'expression du gène *MPK11* est induite en réponse au traitement sidérophore

L'analyse CATMA des feuilles et racines d'*A. thaliana* en réponse à un traitement 1mM DFO a révélé que l'expression du gène *MPK11* est activée par rapport au traitement control. En effet, la moyenne des deux expériences dans les feuilles à 7h post-infiltration (p.i.) montre une expression significativement augmentée de 3,22 fois plus dans la condition sidérophore en comparaison avec la condition eau ($p \text{ value} = 4,77 \times 10^{-10}$). Dans les feuilles à 24h p.i. ou dans les racines à 7h et 24h p.i., *MPK11* n'est pas différentiellement exprimé en réponse au traitement avec le sidérophore.

Afin de confirmer ces résultats, le niveau d'expression de *MPK11* en réponse à DFO a été évalué par quantifications des transcrits *MPK11* par RT-qPCR. Cette expérience a été réalisée plusieurs fois et a permis de confirmer une accumulation plus importante des transcrits *MPK11* chez Col-0 7h p.i. de 1mM DFO, en comparaison avec une infiltration d'eau (Figure 2A).

Pour déterminer si l'accumulation de transcrit *MPK11* est liée aux propriétés de chélation du fer de la DFO, le sidérophore chrysobactine (CB), et un chélateur synthétique du fer, l'acide éthylènediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphénylacétique) ou EDDHA, ont été infiltrés dans des feuilles de Col-0 (Figure 2B et 2C).

Comme la DFO, la CB génère une augmentation des quantités de transcrits *MPK11* dans les feuilles de la plante, ce qui suggère une réponse de la plante à la chélation du fer par ces sidérophores et non une reconnaissance spécifique de la structure de l'une ou l'autre des molécules.

En RT-PCR point final, et en comparaison avec l'infiltration contrôle, l'accumulation des transcrits *MPK11* est également observée en réponse à l'infiltration d'EDDHA. Ce résultat indique qu'une molécule chélatrice du fer, qui n'est pas d'origine biologique, contrairement à un sidérophore, active l'expression de *MPK11*.

Pris conjointement, ces résultats indiquent que la régulation de l'expression du gène *MPK11* est sensible au mouvement et/ou à la disponibilité du fer dans la cellule.

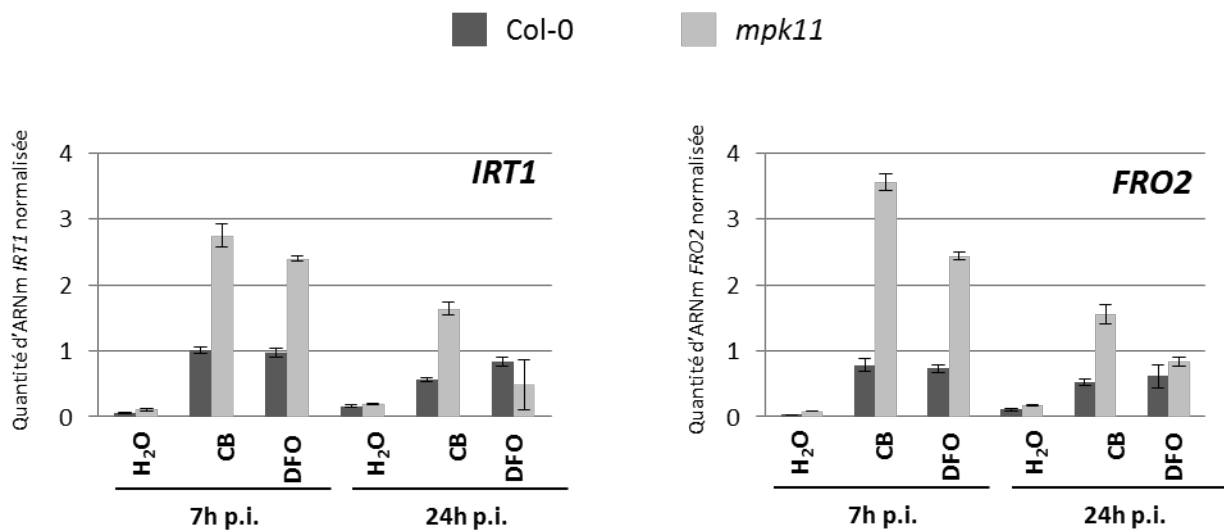


Figure 4: Le rôle de *MPK11* dans les réponses de carence en fer

Les feuilles de *Col-0* sont infiltrées avec de l'eau, 1mM chrysobactine (CB) ou 1mM desferrioxamine (DFO). Les racines sont prélevées à 7h et 24h post-infiltration (p.i.). L'expression des gènes *IRT1* et *FRO2* est évaluée par RT-qPCR à partir des ADNc extraits des racines. L'expression des gènes *IRT1* et *FRO2* est normalisée contre le niveau d'expression du gène *ACT*. Les expériences ont été réalisées deux fois avec des résultats similaires; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. Pour chaque point, 6 plantes sont utilisées et 3 feuilles par plantes sont infiltrées.

L'expression du gène *MPK11* est induite en réponse à l'infection par *D. dadantii*

Le gène *MPK11* est identifié comme un gène de réponse aux MAMP (Bethke et al., 2012; Eschen-Lippold et al., 2012). Afin de déterminer si *MPK11* peut avoir un rôle dans la réponse immunitaire de la plante lors d'une infection par la bactérie *D. dadantii*, nous avons évalué son niveau d'expression en mesurant le niveau de transcrits *MPK11* dans le contexte infectieux (Figure 2C). Dans les feuilles infectées, à 7h et 24h p.i., les transcrits *MPK11* sont finement régulés.

La caractérisation du phénotype du mutant *mpk11* d'*A. thaliana*

Afin de mieux comprendre par quel mécanisme *MPK11* participe à la réponse d'*A. thaliana* à la carence en fer et à l'infection par *D. dadantii*, nous avons travaillé dans un contexte génétique dépourvu de l'expression de *MPK11*, un mutant d'insertion *mpk11*.

La lignée n°04935 de la banque de mutant du Salk Institute est la seule lignée disponible qui comporte l'insertion d'un fragment d'ADN-T dans un exon de la séquence codante du gène *MPK11* (Figure 3A). Un premier travail de sélection des mutants a été effectué afin d'obtenir des plantes homozygotes pour l'insert d'ADN-T. Sur la

Figure 3B, un gel d'électrophorèse montre le résultat de réactions d'amplification d'une séquence du gène *MPK11* avec les amorces du couple c1, ainsi que d'une séquence chevauchant l'extrémité de l'insert d'ADN-T et le dernier exon de *MPK11* avec les amorces du couple c2. Les résultats de la figure 3B confirment alors la présence de l'insert d'ADN-T dans la séquence codante du gène *MPK11* chez le mutant *mpk11*, ainsi que l'état homozygote de l'insertion.

Le gène *MPK11* est impliqué dans la régulation de gènes de réponse à la carence en fer

D'après les résultats des expériences d'infiltration de sidérophores et d'EDDHA, nous avons montré que l'expression de *MPK11* est induite au cours de la signalisation déclenchée par la chélation du fer. De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes codant des protéines responsables de l'acquisition du fer, *FRO2* et *IRT1*, afin de déterminer si l'absence d'expression de *MPK11* perturberait la signalisation induite par le sidérophore.

L'accumulation des transcrits de *FRO2* et *IRT1* a été évaluée par RT-qPCR sur des racines de plantes dont les feuilles ont été infiltrées avec de l'eau ou DFO (Figure 4B). Les racines sont prélevées 7h et 24h p.i.. Chez la plante sauvage Col-0, on retrouve les résultats obtenus précédemment, c'est à dire

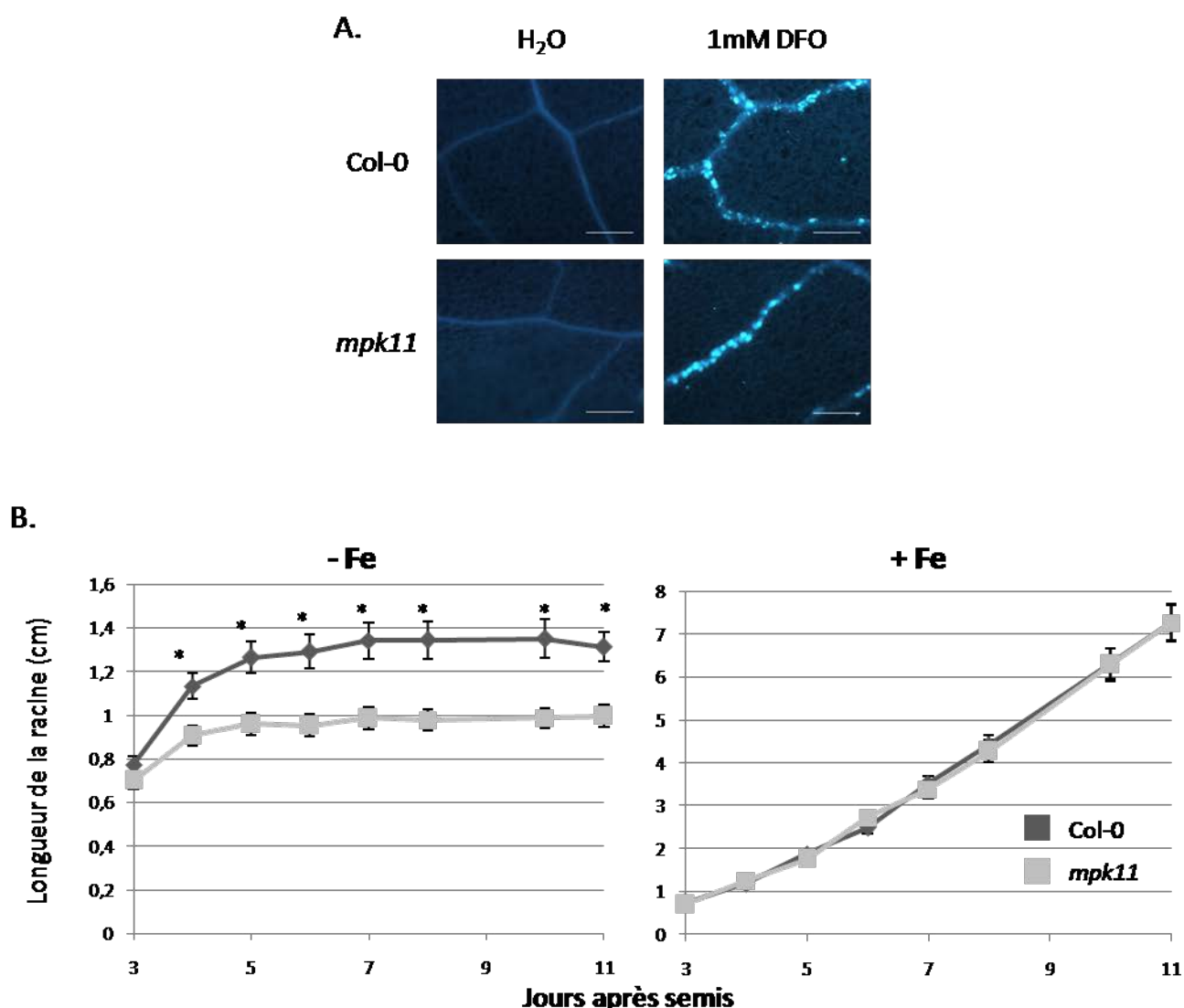


Figure 5: Le mutant *mpk11* n'est pas affecté dans l'accumulation de callose mais dans l'adaptation à la carence en fer.

- A.** Observation des dépôts de callose détectés par une coloration au bleu d'aniline dans des feuilles de Col-0 ou *mpk11*. La moitié d'une feuille est infiltrée avec de l'eau ou 1mM DFO. Les feuilles sont prélevées 24h post-infiltration (p.i.) du traitement, puis colorées au bleu d'aniline et observées au microscope. L'expérience a été réalisée deux fois; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. Pour chaque point, 6 plantes sont utilisées et 3 feuilles par plantes sont infiltrées. Barre d'échelle: 200µm.
- B.** Les longueurs des racines de plantules Col-0 et *mpk11* cultivées sur milieu gélosé Hoagland avec 50µM Fe (+Fe) ou sans ajout de fer (-Fe) sont mesurées pendant 11 jours. L'expérience a été réalisée trois fois; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. Chaque valeur représente une moyenne d'au moins 25 individus. *: test statistique de Kruskal & Wallis, $P < 0,01$.

que l'infiltration de CB ou DFO provoque une forte accumulation de transcrits *FRO2* et *IRT1* par rapport au témoin. Chez le mutant *mpk11*, la tendance des résultats est la même mais les niveaux d'accumulation des transcrits *IRT1* et *FRO2* sont globalement plus importants que chez Col-0. Ces résultats indiquent que *MPK11* réprimerait l'expression des gènes *FRO2* et *IRT1*, et donc serait impliqué dans la régulation négative de la machinerie moléculaire d'acquisition du fer racinaire.

L'obtention de ces résultats nous a amenés à nous questionner sur le phénotype de *mpk11* en condition de carence ferrique (Figure 5B). En effet, si *MPK11* participe à la régulation négative de l'acquisition du fer, en condition limitante de fer l'activation de l'expression de *FRO2* et *IRT1* pourrait permettre au mutant *mpk11* une meilleure adaptation. Pour répondre à cette question, nous avons observé pendant 11 jours les phénotypes de plantules Col-0 et *mpk11* sur des milieux de culture gélosés Hoagland en apportant 50µM de fer, la condition optimale d'apport en fer (+Fe), ou sans ajout de fer dans le milieu (-Fe). En milieu contrôle +Fe, il n'y a pas de distinction morphologique entre les deux génotypes au cours de la cinétique. En condition de carence ferrique, la croissance de Col-0 est affectée notamment au niveau des racines. En effet en condition -Fe, la croissance racinaire s'arrête plus tôt que sur 50µM Fe. En conclusion, la croissance racinaire du mutant *mpk11* est perturbée lorsque le fer est en condition limitante dans le milieu de culture. Ces résultats suggèrent que le gène *MPK11* est nécessaire à l'adaptation des plantes à la carence en fer.

Les résultats d'expression de *FRO2* et *IRT1* en réponse aux sidérophores chez le mutant *mpk11* et son phénotype de croissance racinaire en condition de carence ferrique nous suggèrent que le gène *MPK11* participe à la régulation de l'adaptation de la plante à l'accessibilité du fer. Au vu des résultats, ce contrôle qui est probablement indirect en considérant l'expression de *MPK11* dans les feuilles et d'*IRT1* et *FRO2* dans les racines, pourrait se faire à différents niveaux de régulation et/ou selon le stade de développement de la plante.

L'expression de MPK11 n'est pas requise pour l'apparition de dépôts de callose lors d'un traitement sidérophore.

L'infiltration de sidérophore dans les feuilles d'*Arabidopsis* induit une accumulation de callose dont les dépôts sont situés le long des nervures de la feuille. L'accumulation de callose dans les feuilles du mutant *mpk11* a été étudiée afin de savoir si ce gène est requis pour l'intégrité de ce processus défensif (Figure 5A). Dans les feuilles infiltrées avec DFO à 24h p.i., on détecte des dépôts de callose dans les feuilles traitées alors que les feuilles traitées avec l'eau n'en présentent pas, ce qui confirme les résultats précédemment obtenus. A 24h p.i. DFO dans les feuilles, on observe un patron

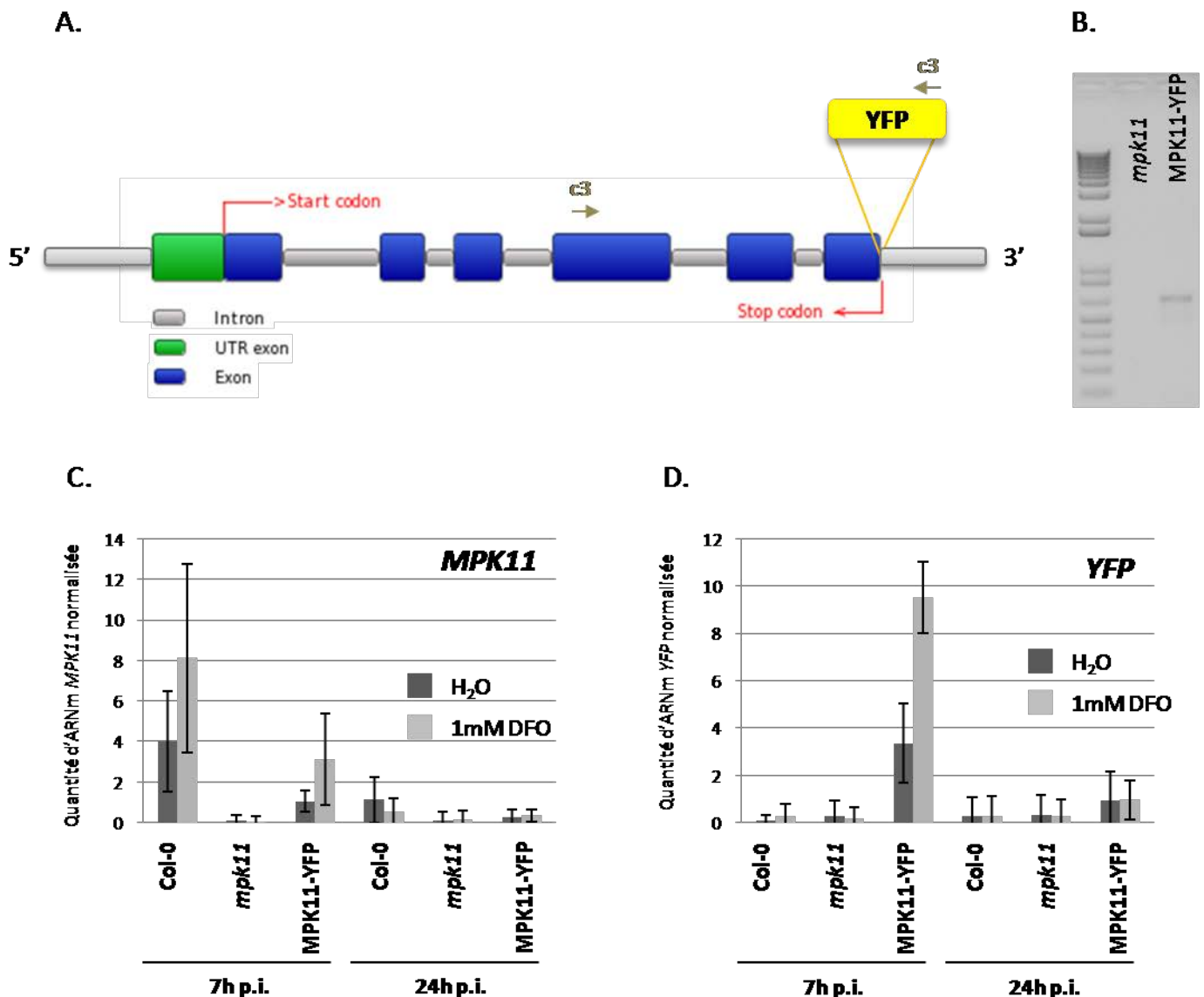


Figure 6: La lignée complémente MPK11-YFP

A. Représentation schématique de la séquence introduite dans le génotype *mpk11*. La localisation du couple d'amorces utilisé lors du génotypage est représentée (c3). (Adapté d'après <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/genes/view/AT1G01560>)

B. Résultats d'amplification par PCR de la séquence fusionnée entre la séquence codante de *MPK11* et la séquence codante de *YFP*.

C et D. Les feuilles de Col-0 sont infiltrées avec de l'eau ou 1mM desferrioxamine (DFO). Les feuilles sont prélevées à 7h et 24h post-infiltration (p.i.). L'expression des gènes *MPK11* (C) et *YFP* (D) sont évaluées par RT-qPCR à partir des ADNc extraits des feuilles infiltrées. L'expression des gènes est normalisée contre le niveau d'expression d'un gène synthétique (*ACT*, *EF1α*). Les expériences ont été réalisées deux fois avec des résultats similaires; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. Pour chaque point, 6 plantes sont utilisées et 3 feuilles par plantes sont infiltrées.

d'accumulation similaire chez les géotypes sauvage et mutant, suggérant que *MPK11* n'est pas impliqué dans le dépôt de callose en réponse au sidérophore.

Construction d'une lignée complémentée du mutant *mpk11* exprimant le marqueur YFP.

Afin de s'assurer que les résultats décrits chez le mutant *mpk11* résultent de l'absence d'expression du gène *MPK11*, et compte tenu de la disponibilité d'un seul mutant d'insertion dans un exon du gène, nous avons entrepris une complémentation de la lignée mutante *mpk11* (collab. J. Colcombet, URGV). Pour ce faire, la construction suivante a été introduite par Agro-infiltration dans le géotype *mpk11*: la séquence nucléotidique depuis le STOP du gène précédent jusqu'avant le STOP de *MPK11*, puis la séquence YFP et la séquence du STOP de *MPK11* jusqu'à l'ATG du gène suivant (Figure 6A). Pour permettre la sélection de lignées homozygotes suite à l'agro-infiltration chez la lignée *mpk11*, cette construction est associée à la résistance au glufosinate, un herbicide à large spectre aussi connu sous le nom commercial Basta®. Si la construction est insérée dans le génome de *mpk11*, les plantes sont résistantes à l'herbicide et l'étude de la ségrégation en descendance du phénotype de résistance permet de sélectionner des lignées dans lesquelles l'événement d'insertion s'est produit une seule fois. Sur la figure 6B, un gel d'électrophorèse montre le résultat de réactions d'amplification d'une séquence fusionnée de la séquence codante de *MPK11* et de la séquence codante de *YFP*. Afin de s'assurer de la transcription de la séquence *MPK11*-YFP insérée dans le géotype mutant *mpk11*, des RT-qPCR ont été réalisées sur des plantes dont les feuilles sont infiltrées avec de l'eau ou 1mM DFO (Figure 6). Ainsi, les transcrits correspondant aux séquences codantes du gène *MPK11* (Figure 6C) et du gène codant la protéine YFP (figure 6D) sont détectés dans la lignée complémentée. Chez *mpk11*, le transcrit *MPK11* n'est pas détectable quelle que soit la condition de culture. D'autre part, le transcrit correspondant à la séquence codante de la YFP est présent uniquement chez la lignée *MPK11*-YFP.

L'anticorps utilisé pour détecter directement la protéine *MPK11* n'étant pas spécifique, la séquence codant la protéine YFP a été insérée avant le codon STOP de la séquence génique de *MPK11*. Cette fusion traductionnelle permet donc d'associer la protéine *MPK11* à YFP. Ainsi des Western Blot ont été réalisés en utilisant l'anticorps anti-GFP qui reconnaît la YFP pour suivre l'accumulation de la protéine *MPK11* (Figure 7A). La protéine *MPK11*-YFP est attendue avec un poids moléculaire d'environ 67kDa, identique à la protéine *MPK4*-YFP produite par la lignée *MPK4*-YFP, utilisée ici comme témoin positif de l'expérience (Berriri et al., 2012). Les résultats de Western blot montrent que l'anticorps anti-GFP permet la détection d'une bande équivalente à une protéine de 67kDa pour les lignées complémentées *MPK11*-YFP et *MPK4*-YFP, et non chez le mutant *mpk11*. Cette bande, qui

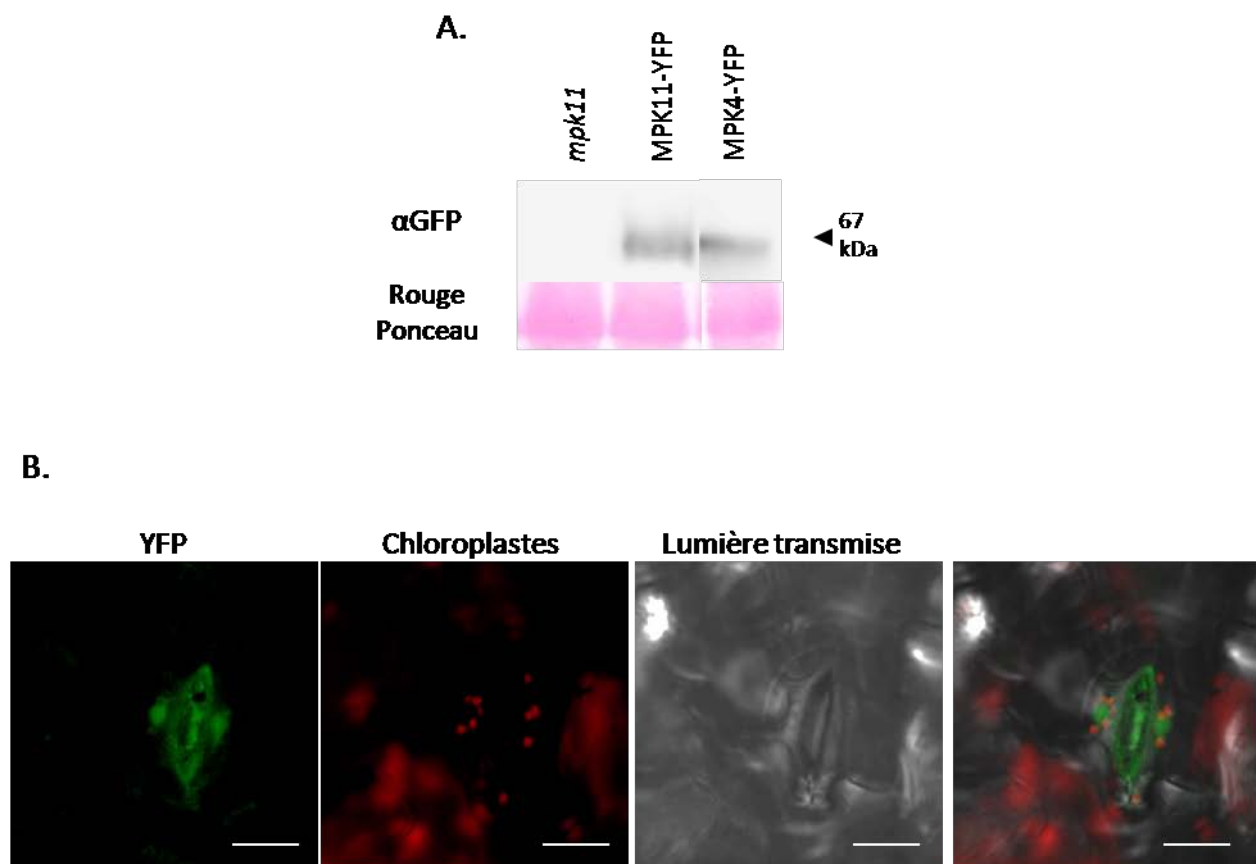


Figure 7: La lignée complétementée exprime la protéine MPK11-YFP

- A.** Détection des protéines MPK11-YFP par Western blot par un anticorps anti-GFP (α GFP). Les feuilles des lignées *mpk11* (contrôle négatif), MPK11-YFP et MPK4-YFP (contrôle positif) sont infiltrées avec de l'eau ou 1mM DFO. Les feuilles sont prélevées à 7h et 24h post-infiltration (p.i.). La détection de la YFP est réalisée à partir d'extraits protéiques issus des feuilles infiltrées. La quantité de protéine totale est évaluée par la coloration au Rouge Ponceau de la membrane d'hybridation. L'expérience a été réalisée deux fois; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. Pour chaque échantillon, 6 plantes sont utilisées et 3 feuilles par plantes sont infiltrées. Méthode: Berriri *et al.*, 2010.
- B.** Observation par microscopie confocale de la localisation cellulaire de la protéine MPK11-YFP dans les feuilles de plantules MPK11-YFP. L'échantillon est excité avec un laser émettant à 514nm. La fluorescence émise par la protéine YFP (vert) est observée dans les noyaux des cellules de garde. L'autofluorescence de la chlorophylle (rouge) permet l'observation des chloroplastes des cellules de garde. L'expérience a été réalisée deux fois; les données sont représentatives de l'ensemble des résultats. 3 feuilles sont observées par expérience. Barre d'échelle: 10 μ m.

correspond à la détection de la protéine MPK11-YFP, assure la présence de la protéine dans la lignée complémentée.

L'expression de YFP permet de visualiser la localisation cellulaire de la protéine MPK11. Sur les clichés de microscopie confocale (Figure 7B), la fluorescence de la protéine YFP est visualisée dans les noyaux des cellules de garde de jeunes feuilles de plantules MPK11-YFP.

Conclusion

Suite aux résultats d'analyse transcriptomique en réponse à l'infiltration de DFO, nous avons choisi d'étudier le rôle de *MPK11* dans la réponse d'*A. thaliana* aux sidérophores.

Pour ce faire, nous avons confirmé l'induction de l'expression du gène *MPK11* lors de l'infiltration de la DFO, mais également de la CB, un sidérophore de structure différente, et de l'EDDHA, un chélateur synthétique de fer.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents au rôle de *MPK11* en réponse à la chélation du fer cellulaire, nous avons étudié les phénotypes du mutant *mpk11* en réponse à la DFO. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'expression des gènes *FRO2* et *IRT1*, codant les protéines assurant l'acquisition du fer racinaire, est perturbée chez le mutant en réponse à l'infiltration de sidérophore. De plus, ce mutant présente un phénotype aggravé lorsqu'il est cultivé dans un milieu limité en fer. Ces résultats nous suggèrent que *MPK11* est nécessaire à l'adaptation de la plante lorsque la disponibilité en fer est limitée.

La construction d'une lignée complémentée stable du mutant *mpk11*, exprimant le gène *MPK11* fusionné à la séquence codant de YFP (MPK11-YFP), a été réalisée. Dans cette lignée, l'expression du gène *MPK11* est rétablie, et la protéine est exprimée, notamment dans les noyaux des cellules de garde.

Discussion

Grâce à l'application des sidérophores, DFO et CB, et du chélateur de fer EDDHA, nous avons mis en évidence que la chélation du fer dans les feuilles déclenche l'accumulation des transcrits *MPK11*. Dans les trois conditions cette augmentation est observée à 7h p.i. puis est atténuée à 24h p.i.. Cette valeur, obtenue par analyse RT-qPCR, est en accord avec la valeur d'expression de *MPK11* obtenue lors de l'analyse transcriptomique en réponse à 1mM DFO dans les feuilles d'*A. thaliana*. En réponse

à 1µM des MAMP flg22, efl18 et ch8, les transcrits de *MPK11* sont très fortement accumulés, et ce dès 30 min après le traitement (Bethke et al., 2012; Eschen-Lippold et al., 2012). Etant donné la différence de concentration des traitements appliqués et de l'ampleur de la réponse, il est possible qu'un mécanisme différent soit à l'origine de l'expression du gène *MPK11* en réponse à un MAMP et à l'origine de la réponse à la chélation du fer.

En plus de l'identification de *MPK11* dans la signalisation en réponse aux MAMP, l'accumulation des transcrits du gène est provoquée par les stress biotiques en général, comme en conséquence de l'infection par différents types d'agents pathogènes (Tableau 1). Nous avons montré que l'expression du gène *MPK11* est induite lors de l'infection par la bactérie pathogène *D. dadantii*. *D. dadantii* sécrète les sidérophores CB et achromobactine lors de l'infection d'*A. thaliana*. Afin de savoir si l'expression de *MPK11* observée au cours de l'infection résulte de l'activation par les MAMP et/ou de la chélation du fer par les sidérophores, il serait intéressant d'utiliser un mutant de biosynthèse ou d'acquisition des sidérophores de *D. dadantii*.

L'étude des phénotypes du mutant *mpk11* en réponse au sidérophore nous a permis d'identifier un rôle de *MPK11* dans l'adaptation de la plante à la carence en fer. En réponse à la chélation du fer dans les feuilles de *mpk11* par les sidérophores CB et DFO, on observe dans les racines de la plante une augmentation coordonnée des transcrits des gènes *FRO2* et *IRT1*, des gènes marqueurs de la carence en fer. Ces résultats suggèrent que *MPK11* participe à la répression de la réponse de carence en fer mise en place par la plante. Or, le phénotype morphologique des racines de *mpk11* en milieu carencé en fer suggère que l'expression de *MPK11* est requise pour l'adaptation de la plante à la carence en fer. Il est possible que *MPK11* contribue différemment à la régulation du métabolisme de la plante au manque de fer lors d'un stress ponctuel, tel qu'il se produit au cours d'une infiltration de sidérophore, et lors d'une contrainte appliquée à plus long terme, telle que la croissance sur un milieu sans fer.

Au cours de ce travail, dans les feuilles traitées avec la DFO, l'observation des dépôts de callose et d'accumulation du H₂O₂ nous indique que l'élévation du niveau de défense liée à ces deux réponses est sous le contrôle d'une signalisation indépendante de l'expression de *MPK11*.

Contrairement au mutant *mpk4*, qui présente un phénotype sévère de croissance, l'absence de phénotype fort du mutant *mpk11* dans des conditions standard, suggère que *MPK11* n'est pas indispensable à la croissance de la plante et que la perte fonctionnelle chez le mutant est compensée, par *MPK4* par exemple.

Les résultats de ce travail tendent à montrer que MPK11 est impliqué dans la régulation du métabolisme du fer, et est nécessaire la croissance de la plante lorsque le fer est limitant. L'obtention d'une lignée complémentée du mutant *mpk11* nous assurera que les réponses au sidérophore et le phénotype en carence en fer résultent du défaut d'expression du gène *MPK11*. Effectivement, si MPK11 régule l'expression des gènes *FRO2* et *IRT1* les différences observées entre *mpk11* et Col-0 ne devraient plus exister entre MPK11-YFP et Col-0. De même, le niveau de croissance racinaire de la lignée MPK11-YFP devrait être similaire à Col-0 quel que soit la concentration en fer du milieu de culture.

D'autre part, la régulation des MAPK est assurée majoritairement par phosphorylation et déphosphorylation. L'augmentation quantitative des transcrits du gène et de la protéine n'est pas nécessairement corrélée à une plus forte activité de la protéine. La fusion transcriptionnelle entre le gène *MPK11* et *YFP* nous permet l'obtention d'une protéine de fusion MPK11-YFP. En reconnaissant spécifiquement cette protéine de fusion avec un anticorps dirigé contre la GFP, nous pourrions déterminer si l'infiltration de sidérophore dans les feuilles provoque l'accumulation de la protéine MPK11. De plus, nous pourrions réaliser des tests d'activité kinase de la protéine MPK11 afin de savoir si la chélation du fer par les sidérophores provoque l'activation de la protéine.

Méthodes :

Tableau des amorces

couples d'amorces	séquence 5' > 3'	séquence 3' > 5'
c1	AGGAGCAAGTTACTCGGTTTTAAA	TTGGATACTGTGGAAGCTGTCTTA
c2	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	CCTTGATGTTCTCTCCGTCA
c3	AGGAGCAAGTTACTCGGTTTTAAA	GATCTTGAAGTTCACCTTGACGC
MPK11-5	NNCTCGAGTAACTATAAATGTTTGACAGATGGTTTTAC	NNGGATCCAGGGTTAACTTGACTGATTCACGATAT
MPK11-3	NNGGATCCTAAGATTCTTAGTGTGTGAGATTTTAAGAGAATC	NNGCGCCGCTAGCCAATAAAATGAAAAATGTGAATCACATG

Construction de la lignée *mpk11* exprimant MPK11-YFP

Une séquence de 2611 nucléotides en amont du codon STOP de MPK11 a été amplifiée avec le couple d'amorces MPK11-5, par PCR (enzyme iProof, BioRad), afin de générer une séquence nommée MPK11-5, contenant un site de restriction Xho1 en 5' et BamH1 en 3'. De façon similaire, la séquence de 986 nucléotides en aval du codon STOP a été amplifiée avec le couple d'amorces MPK11-3 et permet de générer une séquence nommée MPK11-3 contenant un site de restriction BamH1 en 5' et Not1 en 3'. La séquence MPK11-5 a été clonée dans un plasmide pGEMTeasy contenant la séquence codante de la YPF (Berriri et al., 2012). La séquence MPK11-3 a ensuite été sous-clonée dans ce même vecteur contenant MPK11-5. La séquence MPK11-5-YFP-MPK11-3 a ensuite été sous clonée dans le plasmide pGREEN0229. Toutes les constructions ont été confirmées par séquençage. La souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pSOUP a été transformée avec pGREEN0229 (Hellens et al., 2000). Le mutant *mpk11* a été transformé par « Floral Dip Methode » (Clough and Bent, 1998). La descendance résistance au Basta[®] a été sélectionnée et confirmée par PCR.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA REPARTITION DU FER AU COURS
DE L'INTERACTION ENTRE *A. THALIANA* ET *D.*
DADANTII

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA REPARTITION DU FER AU COURS DE L'INTERACTION ENTRE *A. THALIANA* ET *D. DADANTII*

Préambule

Les résultats obtenus au laboratoire ont montré qu'en réponse à l'infection par *D. dadantii*, *A. thaliana* met en place des réponses de défense qui requièrent les protéines AtFER1 et NRAMP3, assurant respectivement le stockage du fer dans le chloroplaste et le transport du fer vacuolaire vers le cytosol (Dellagi et al., 2005; Segond et al., 2009).

Afin de mieux comprendre comment le fer contenu dans le tissu végétal est réparti au cours de l'interaction, nous avons utilisé la coloration Perls'-DAB-H₂O₂, mise au point par l'équipe de C. Curie (CNRS Montpellier), pour visualiser le fer au site d'infection. Cette technique nous a permis d'étudier la distribution du fer dans les tissus macérés et les tissus sains au cours de l'interaction.

Les résultats de cette étude vous sont présentés sous forme la forme d'un projet d'article qui sera prochainement soumis au journal « Molecular Plant Pathology ».

Title of the manuscript: Alterations of iron distribution in Arabidopsis tissues infected by *Dickeya dadantii*

Authors:

Aude Aznar^{1,2}, Oriane Patrit³, Alia Dellagi^{1,2}

Corresponding author: Alia Dellagi

Address: ¹Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr (RD 10), F-78026 Versailles Cedex, France. ² Univ Paris 06, Case 156,4 Pl Jussieu, F-75005 Paris, France. ³AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris cedex 05 France

Phone: +33 1 30 83 32 40

E-mail: dellagi@agroparistech.fr

Summary

Dickeya dadantii is a plant pathogenic enterobacterium responsible for plant soft rot disease in a wide range of hosts including the model plant *Arabidopsis thaliana*. For the first time, upon *D. dadantii* infection, iron distribution in infected *A. thaliana* was investigated at the cellular scale using the Perls'-DAB-H₂O₂ method. Iron visualization during infection reveals a loss of iron from cellular compartments and plant cell walls. During symptom progression, two distinct zones are clearly determined: a macerated zone displaying weak iron content and a healthy zone displaying strong iron content. Immunolabelling of cell wall methylated pectin shows that pectin degradation is correlated with iron release from cell wall indicating a strong relationship between cell wall integrity and iron in the plant tissue. Using a *D. dadantii* lipopolysaccharide antibody, we show that bacteria are restricted to the infected tissue, and that they accumulate iron *in planta*. This work shows that iron localization is strictly correlated with bacterial cell localisation in the infected tissue indicating a crucial role of this element during the interaction. It also shows that Perls'-DAB-H₂O₂ is a method of choice to analyse iron distribution at the cellular level during plant-microbe interaction.

Introduction

Iron is an essential nutrient for fundamental metabolic processes in living organisms. Indeed, owing to its capacity to undergo reversible changes in its oxidation states over a wide range of redox potentials, this metal is involved in an important number of electron transfer reactions. Cellular metabolism uses iron-containing cofactors consisting of Fe-S clusters or heme to transfer electrons during photosynthesis, respiration, nitrogen fixation, DNA synthesis and degradation of reactive oxygen species. Although iron is the fourth most abundant element on earth, it is poorly bioavailable due to low solubility of ferric oxyhydroxides prevailing in aerobic soils. Under reductive conditions, iron is under the ferrous form (Fe^{2+}) and is more soluble (Lindsay & Schwab, 1982). However Fe^{2+} can catalyze the Fenton reaction in the presence of hydrogen peroxide, thus leading to the formation of hydroxyl radicals resulting in protein denaturation, DNA breaks and lipid peroxidation (Pierre & Fontecave, 1999). The absolute requirement of iron and its potential toxicity, has constrained living organisms to develop tight control of iron uptake and storage.

Plants acquire iron from the soil through the roots. Two strategies of iron uptake have been described (Marschner, 1995, Briat *et al.*, 2007, Kim & Guerinot, 2007). Strategy I based on reduction of iron then transport via a membrane transporter of the Iron Regulated Transporter (IRT1) family. Strategy II, found only in poaceae, employs a chelation based strategy which consists of extrusion of phytosiderophores that chelate iron in the rhizosphere and then import of the iron-phytosiderophore complexes by the roots. Iron distribution to different organs and in the cellular compartments is mediated by divalent metal chelators such as nicotianamine or citrate which are allowed to cross membranes by transporters from the YSL family or the protein FRD3 (Morrissey & Guerinot, 2009). Iron is mainly stored in the ferritin shell of mesophyll cell chloroplasts (Briat *et al.*, 2010). Arabidopsis genome contains four ferritin coding genes *AtFER1-4*. Ravet *et al.* (2009) showed that they mainly play antioxidant functions in Arabidopsis. Iron can also be stored in mitochondria (Nouet *et al.*, 2011), or in the vacuoles of mature embryo endodermal cells (Lanquar *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2006). Important amounts of iron were recently detected in the nucleolus (Roschztardt *et al.*, 2011). The role and exact status of this iron is not known yet.

Dickeya dadantii (formerly named *E. chrysanthemi* 3937) is an enterobacterium that causes soft rot on economically important crops including potatoes, chicory and ornamentals like saintpaulia plants (Pérombelon, 2002). Bacterial cells invade the intercellular spaces of parenchymatous tissues and secrete large amounts of plant cell wall degrading enzymes (CWDE) leading to tissue disorganization

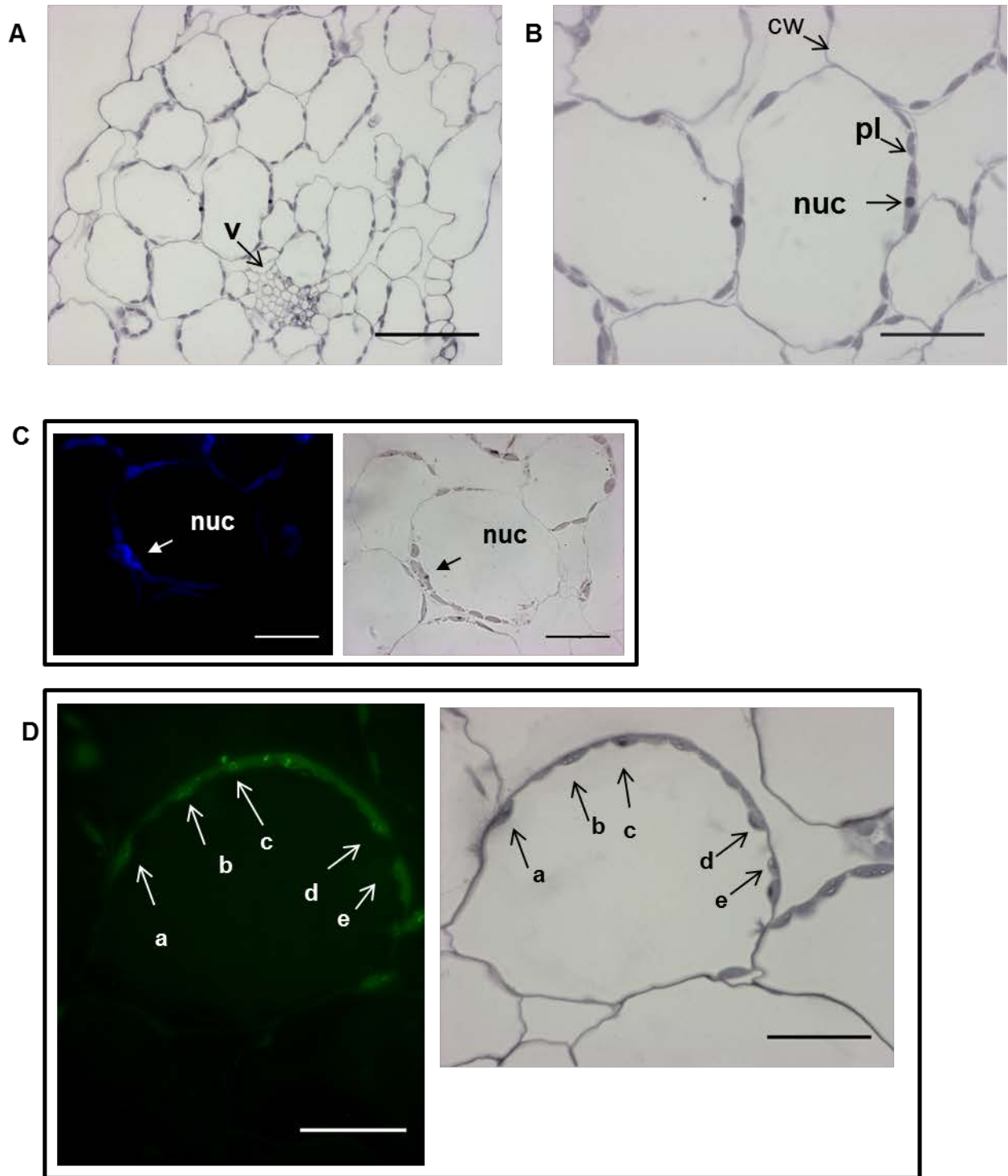


Figure 1 : Characterization of iron localization sites in Arabidopsis leaves. A and B : Perls-DAB-H₂O₂ staining of healthy leaf tissue. Scale bar: (A) 50µM, (B) 20 µm. C: Co-localization of nucleolus by DAPI staining (arrow in left panel) and by Perls-DAB-H₂O₂ staining (arrow in right panel). Scale bar: 20µm. D: Co-localization of iron in plastids by anti-AtFer1 immunolabeling (arrow sin left panel) and by Perls-DAB-H₂O₂ staining (arrows in right panel); scale bar: 20µm. cw: cell wall, nuc : nucleolus, pl: plastid, v: vascular tissue.

and maceration symptoms (Murdoch *et al.*, 1999, Grimault *et al.*, 1997). Under iron limiting conditions, most microbes synthesize and secrete low molecular weight compounds called siderophores, designated to scavenge iron and then to deliver it in the bacterial cell. *Dickeya dadantii* synthesizes two siderophores: achromobactin (Munzinger *et al.*, 2000) and chrysobactin (Persmark *et al.*, 1989). Both siderophores are required for the systemic progression of maceration symptoms on the hosts (Enard *et al.*, 1988, Dellagi *et al.*, 2005, Santos *et al.*, 2001). Leaf treatment with chrysobactin provokes perturbations of iron distribution which lead to the activation of immune responses indicating that siderophores produced during infection disturb iron homeostasis and defense (Dellagi *et al.*, 2009). Limiting iron supply to Arabidopsis plants results in reduced maceration symptoms (Kieu Phuong *et al.*, 2012). Thus *D. dadantii* bacterial cells require the presence of physiological amounts of iron to invade plant tissues (Franza & Expert, 2013). Interestingly, the AtFER1 ferritin protein was shown to accumulate during Arabidopsis infection by *D. dadantii* and an *atfer1* mutant was more susceptible to infection (Dellagi *et al.*, 2005). The role of AtFER1 in this context was attributed to its iron scavenging activity which could deprive invading bacteria from iron. In addition, iron transport across the vacuolar membrane via the proteins AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is involved in the amplification of oxidative stress thus contributing to the plant defense (Segond *et al.*, 2009). These data show that iron is a key modulator of the plant's susceptibility to the pathogenic bacterium *D. dadantii*.

To further investigate the role of iron during this interaction, we studied the localization of iron during disease progression in the tissue. We used a newly developed histochemical staining method based on Prussian blue staining combined with diaminobenzidine amplification. The method named Perls-DAB-H₂O₂ (PDH) allows the precipitation of non heme iron with the Perls reagent followed by intensification owing to the DAB oxidation by H₂O₂. This method is specific for Fe³⁺ staining because the staining of Fe²⁺ or other metals is very poor (Roschztardt *et al.*, 2010).

In this work, we visualized alterations of iron distribution in the infected tissue at the cellular level. This method allowed us to determine precisely the localization of iron in infected tissues and to compare this localization with the presence of bacteria, the level of cell wall degradation and ferritin accumulation. This novel iron staining method will provide a crucial contribution to the better understanding of the mechanisms underlying plant-microbe interactions known to be influenced by the iron status of the host and/or the microbe.

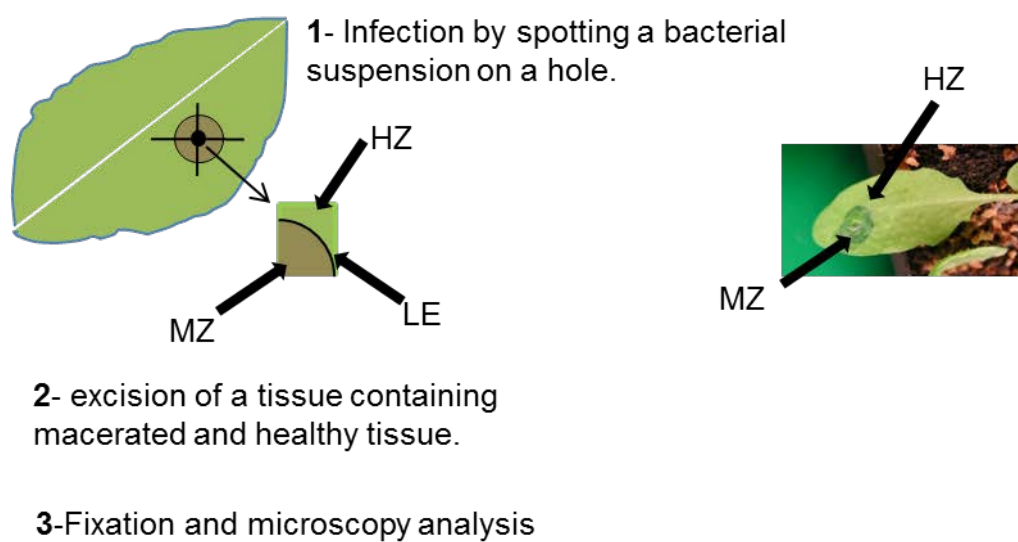


Figure 2 : Description of the experimental procedure used to analyze iron localization during symptom progression. HZ: Healthy zone, MZ, macerated zone, LE: leading edge of maceration.

Results

Characterization of physiological patterns of iron distribution in *A.thaliana* healthy leaf tissue

To visualize iron in the plant tissue, we used Arabidopsis leaf samples fixed and embedded in LR white resin (see materials and methods). In order to check that PDH staining (Roschztardt et al., 2010) allowed the localization of iron in *A. thaliana* tissues under our conditions, we first performed observations on healthy leaf tissues. For this purpose, leaves from 5 week old seedlings grown on soil, were collected and semithin sections were stained with PDH before microscopic observations. Cell walls and plastids were strongly stained. The iron staining was also particularly strong in the nucleus where it seemed to concentrate in a spherical structure which we assumed to be the nucleolus. To check this, we stained consecutive sections with PDH and with DAPI. We selected two consecutive sections one of which was PDH stained and the second stained with DAPI because PDH staining could not be combined on the same section with DAPI. DAPI strongly stained the nuclei but not the nucleoli, thus allowing us to identify the nucleolus. The strong iron spot visible with PDH in the nucleus co-localizes with the nucleolus visible in DAPI staining. These data are in agreement with previous reports on the presence of high iron amounts in the nucleolus of pea cells (Roschztardt et al., 2011).

In some of the *A. thaliana* mesophyll cells, dark stained spots could be observed in the plastids after PDH staining. To check whether these spots correspond to ferritin, we used consecutive sections one of which was stained with PDH and the other was hybridized with the anti-AtFER1 antibody (Dellagi et al., 2005). Figure 1E, F show that the AtFER1 antibody hybridizes to the plastids and that it co-localizes with the dark spots visible in the PDH stained section. Taken together, these data indicate that the PDH staining method used under our conditions is a relevant method to study iron distribution at the microscopic level because we were able to see iron at sites described in the literature (Nouet et al., 2011).

Modification of iron distribution during tissue infection by *D. dadantii*

Dickeya dadantii infects plants by invading intercellular spaces of parenchymatous tissues where bacteria multiply and progress by degrading the neighbouring cell walls (Murdoch et al., 1999, Grimault et al., 1997). Degradation of cell walls is due to the secretion of large amounts of pectinases by bacterial cells (Murdoch et al., 1999). To investigate the cellular distribution of iron during the infection progress of *D. dadantii* cells in *A. thaliana* leaf tissue, leaves were inoculated by a method published earlier which allows a progressive development of the symptom (Fagard et al., 2007). It consists of making a hole with a sterile needle followed by the deposition of 5 μ L of a bacterial

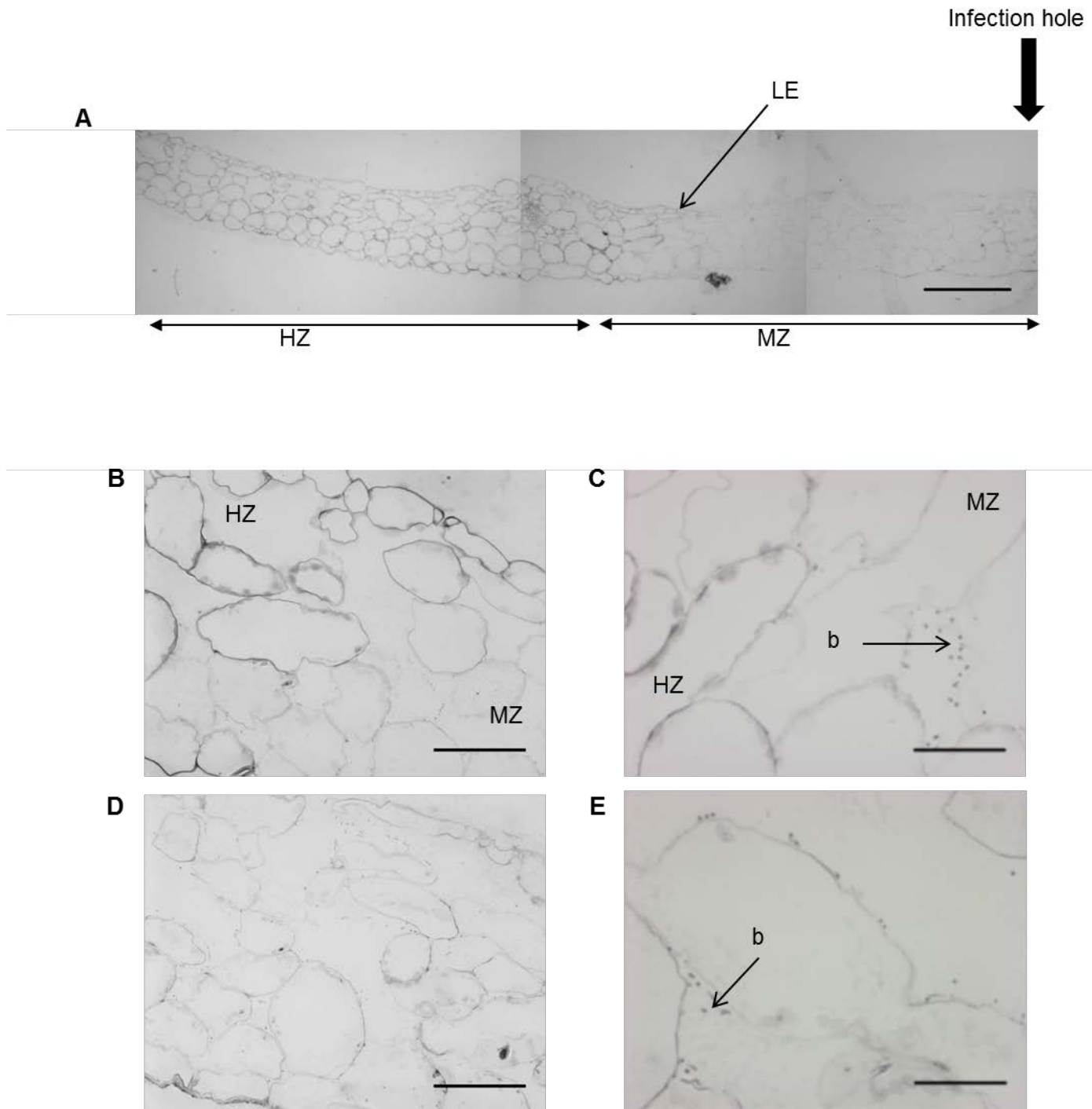


Figure 3 : Iron localization in healthy and infected zones by Perls-DAB-H₂O₂ staining. **A**: Three pictures mounted side by side spanning the MZ and the HZ. Perls-DAB-H₂O₂ staining is reduced in cell walls, plastids and in nuclei of the MZ cells. Scale bar: 200µm. **B** and **C** : enlargements of the LE zone. A clear difference of staining is observed at the LE of maceration. **D** and **E** : enlargements of the MZ zone. Small strongly stained spots correspond to bacteria. Scale bar: (B,D) 50µm, (C,E) 20µm. HZ: Healthy zone, MZ, macerated zone, LE: leading edge of maceration. b: bacteria

suspension at a density of 10^7 C.F.U. mL⁻¹ (Figure 2). We chose leaf samples where the infection was in progress at stage 2 as described by Kieu Phuong et al. (2012). The diameter of the lesion was about 3 mm around the hole. Samples were selected so as to contain both healthy and macerated tissue and fixed as indicated in materials and methods. Following PDH staining, we could see two distinct zones with different intensities of PDH staining (Figure 3A). Iron staining was weaker on the side close to the infection hole. This zone corresponds to a tissue which is starting to be disorganized. In this zone, iron could hardly be detected in cell walls, chloroplasts or in nuclei. On the other side of the sample, the staining of iron was strong and evenly distributed in cell walls and plastids. A clear-cut boundary separates the strongly stained zone and the weakly stained zone. We concluded from these observations that the tissue contained two distinct zones: a macerated zone (MZ) that was weakly stained with PDH, and a healthy zone (HZ) that was strongly stained with PDH. The shift of PDH staining between HZ and MZ is not progressive, it is sudden. Indeed, at the leading edge of infection (LE), a clear distinction between healthy cells and dying cells is observed (Figure 3B). Staining of cell walls and plastids in MZ is much reduced indicating a loss of iron. However, some regions of cell walls remain stained indicating that iron is more strongly bound in some parts of the cell wall. Interestingly, neither nuclei nor nucleoli are visible in the MZ. Rod shaped structures with very strong PDH staining are visible in the intercellular spaces of the MZ (Figure 3C, 3E). These elements are presumed to be bacteria (see confirmation below). Taken together, these data indicate that during its progression in the leaf tissue, *D. dadantii* causes loss of iron from dedicated cellular compartments and cell walls. Bacterial cells contain high iron concentration during the infection process.

Comparative localization of iron, bacteria and intact cell walls during the infection process

We investigated whether loss of iron from the cell walls was correlated with cell wall degradation. Pectin de-methylation is the first step of cell wall degradation by *D. dadantii* pectinases (HugouvieuxCottePattat *et al.*, 1996, Reverchon & Nasser, 2013). Thus, we monitored the level of cell wall integrity in the tissue using an antibody raised against highly methylated pectin, JIM7 (Vandenbosch *et al.*, 1989, Knox *et al.*, 1990). For this purpose, we performed JIM7 immune-labeling and PDH staining on consecutive semithin sections of the same samples. Figure 4 shows that in healthy tissue, JIM7 immuno-labeling is evenly distributed along cell walls. This observation indicates that cell walls are undamaged in the HZ. In the colonized tissue of MZ, JIM7 immuno-labeling is very reduced. Cell wall integrity is thus strongly affected in this zone. However, some small portions remain labeled with JIM7 antibody indicating that cell wall degradation was not complete, which is reminiscent of what we observed with the PDH staining. These data indicate that iron is

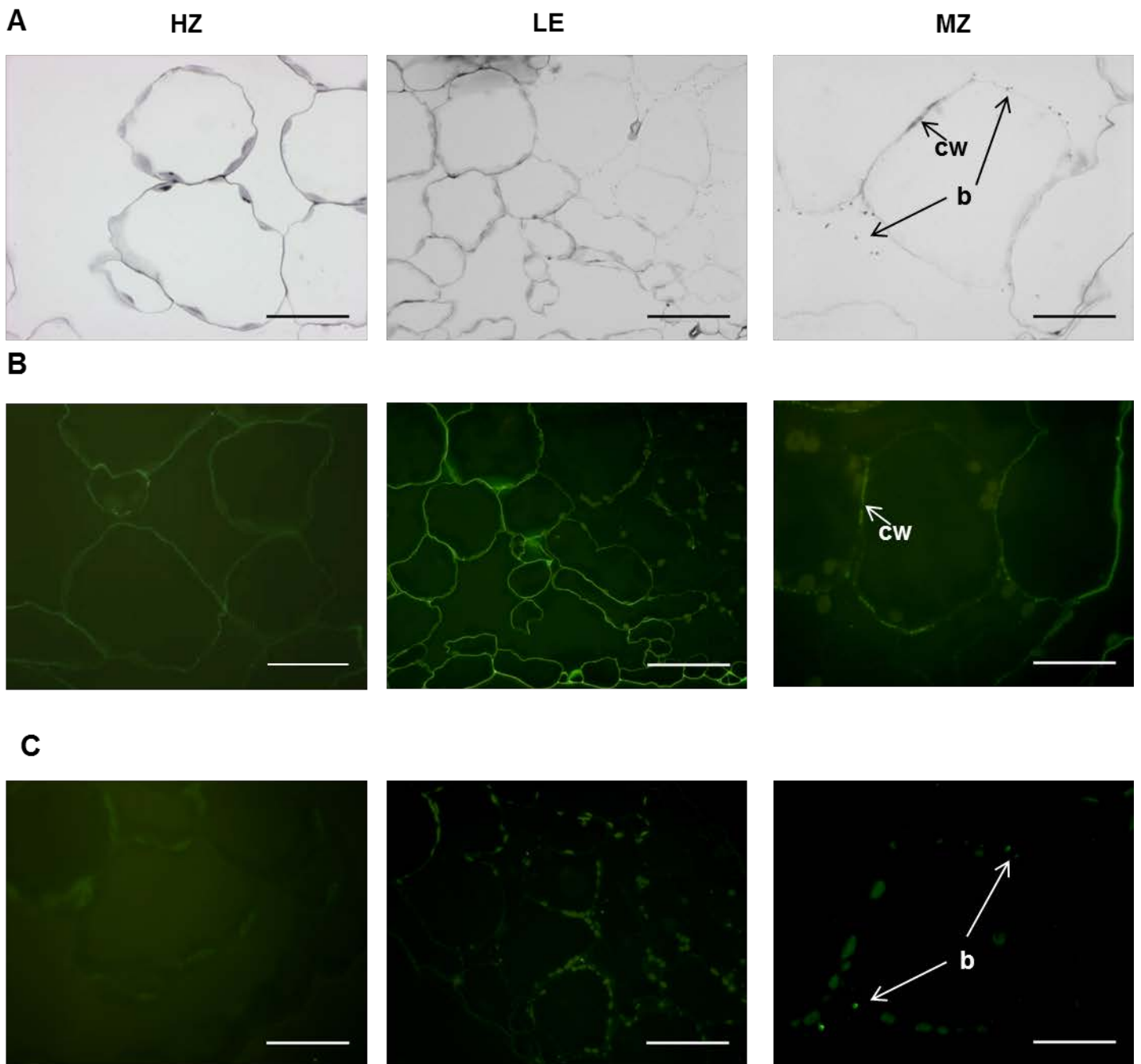


Figure 4 : Localization of iron, bacteria and intact cell walls in an infected *Arabidopsis* leaf. **A**: Perl's-DAB-H₂O₂ staining. **B**: Anti-methylated pectin immunolabeling using JIM7 antibody indicates intact cell walls. Staining is reduced in MZ because of bacterial CWDE activities. **C**: Anti-*Dickeya dadantii* lipopolysaccharide immunolabeling. Bacteria are visible in HZ and LE. A, B and C represent the same tissue. Consecutive sections were used in order to be able to co-localize iron, intact cell walls and bacterial cells. Scale bar: (HZ, MZ) 20µm, (LE) 50µm. HZ: Healthy zone, MZ, macerated zone, LE: leading edge of maceration. b: bacteria, cw : cell wall.

strongly associated to cell walls in Arabidopsis leaves and that during bacterial progression in the tissue, cell wall iron is released.

To investigate the localization of bacteria in the different zones, we used an antibody raised against a specific *D. dadantii* envelope component, the lipopolysaccharide (LPS). Immunolocalization of *D. dadantii* bacterial cells in the sample indicates that they are restricted to the intercellular spaces of the macerated zone. LPS labeling is visible around the bacterial cells. These data confirm that the rod shaped structures stained by PDH are *D. dadantii* cells.

Taken together these data indicate that pectin degradation is correlated with iron release from the cell wall and that bacterial cells accumulate iron in the infected tissue.

Immunolocalization of ferritin during the infection process

Iron mobilization in the infected tissue is likely to provoke perturbations of iron homeostatic genes. In response to *D. dadantii* infection, the ferritin AtFER1 protein accumulates and is involved in the limitation of infection (Dellagi et al., 2005). To investigate the tissue localization of AtFER1 during infection, we performed immunolabeling with the anti AtFER1 antibody (Dellagi et al., 2005). In the non infected control, AtFER1 was hardly detected in very few cells (Figure 5B). In the infected sample, AtFER1 was detected neither in the MZ nor in the LE. The healthy zone could be subdivided in two subzones according to their ferritin content: HZ1 and HZ2 (Figure 5A). In the HZ2, close to the LE, no signal was detected with the anti-AtFER1 antibody. In the HZ1, which corresponds to the cells further away from the maceration front, AtFER1 proteins accumulate in the chloroplasts. These data confirm previously described results showing that AtFER1 accumulates during infection. The cellular localization allows a more precise description of this process. The AtFER1 protein accumulates ahead of the bacterial progression.

Discussion

We have investigated for the first time the localization at the cellular level, of iron in tissue of Arabidopsis leaves during infection by the bacterial pathogen *D. dadantii*.

During progression of the bacterial pathogen in the leaf tissue of Arabidopsis, iron is depleted from cell walls and from cellular compartments that normally contain high amounts of iron such as plastids. This depletion raises the question of the fate of iron during infection. One possibility is that it is absorbed by bacterial cells. As we could observe in the macerated tissue, bacteria are strongly stained by the PDH indicating that they are loaded with iron. Thus, they probably benefit from release of high amount of this element for growth. However, strong oxidative stress is also probably

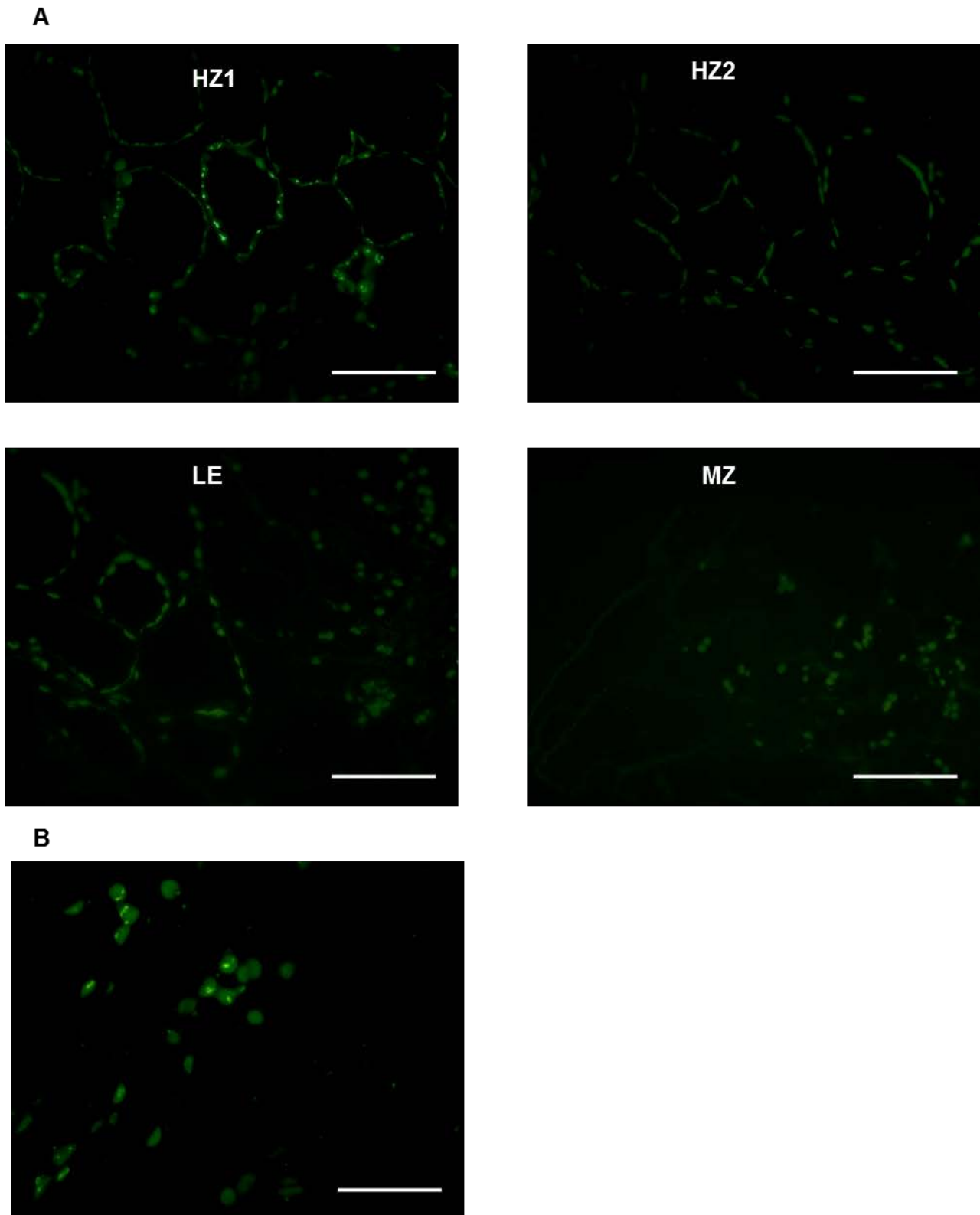
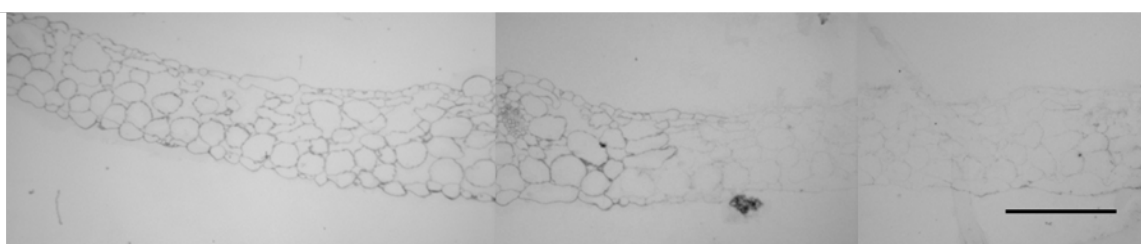


Figure 5 : Ferritin localization in an infected *Arabidopsis* leaf. Sections of infected tissue (A) or healthy tissue (B) were immunolabeled using an anti-AtFER1 antibody. In A, two different HZ were identified. In HZ1 ferritin was abundantly present. In HZ2 (close to the LE), no ferritin could be detected. Scale bar: (A) 50µm, (B) 20µm HZ: Healthy zone, MZ, macerated zone, LE: leading edge of maceration.

caused as a consequence of the presence of free iron in the intercellular spaces. A strong oxidative stress occurs in *Arabidopsis* leaves in response to *D. dadantii* (Fagard et al, 2007). This oxidative stress is mainly mediated by the NADPH oxidase RBOHD. Free iron could contribute together with this enzyme to the amplification of ROS accumulation. Consistently, the accumulation of ROS in response to *D. dadantii* was drastically reduced in iron starved plants (Kieu Phuong et al, 2012). In addition, iron transport across the vacuolar membrane via the proteins AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is involved in the amplification of oxidative stress thus contributing to the plant defense (Segond et al., 2009). In maize plants grown under adequate iron nutritional status, the establishment of hemibiotrophic pathogen *Colletotrichum graminicola* was retarded as compared to iron starved plants (Ye et al Physiol Plant 2014). The authors observed that the retarding effect of Fe on *C. graminicola* development coincided temporally and spatially with the recruitment of Fe to infection sites and a local accumulation of H₂O₂. Similarly, in barley, infection by the fungal pathogen *Blumeria graminis* triggers iron accumulation in the epidermal cells attacked by the fungal appressorium. This iron accumulation provokes a strong oxidative stress which leads to callose deposition thus preventing further infection (Liu et al 2007). Together, these data show that modifications of iron localization can be observed during plant–microbe interactions and that they can provoke oxidative stress thus contributing to immunity.

Iron release from dying cells can also provoke a movement towards healthy tissue thus explaining the accumulation of the ferritin AtFer1 behind the LE. These data confirm previous observations of ferritin accumulation around the maceration at a macroscopic level using transgenic plants expression a GUS fusion under the control of *AtFER1* promoter (Dellagi et al., 2005). The data reported here provide more detailed description of AtFer1 localization during infection. The accumulation of AtFER1 ahead of the LE could reflect an iron buffering effect to protect cells from oxidative damage. This pattern of AtFER1 accumulation can also constitute a barrier by scavenging iron to prevent its acquisition by invading bacteria.

Our data show that pectin degradation is very strongly correlated with the release of iron from cell walls. This shows that the cell wall structure is an important site for iron storage. It is well known that phenolic compounds present in the cell walls chelate high amounts of iron (Marschner *et al.*, 1986). More data are available about iron in root apoplast than on leaf apoplast (Nikolic & Romheld, 2007, Longnecker & Welch, 1990). However, the exact role and localization of iron in this structure is not well understood. Our data show that a strong correlation exists between integrity of the cell wall and the presence of iron. This is particularly obvious in the MZ where some cell walls are partially

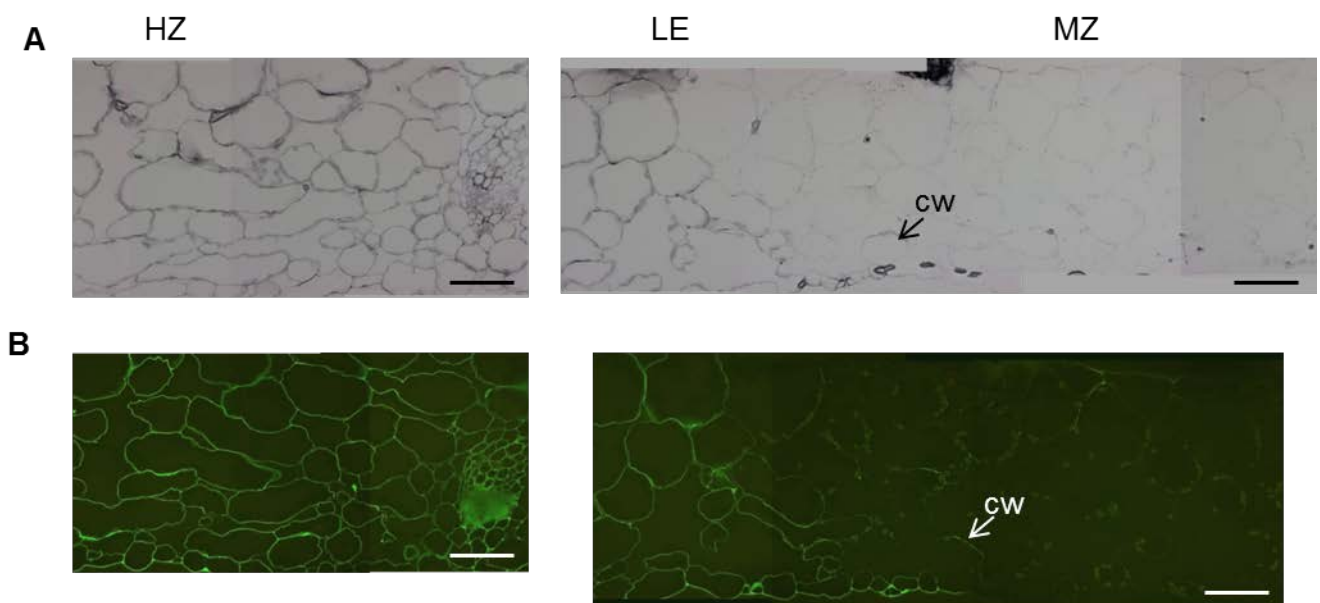


Element	Healthy Zone 1	Healthy Zone 2	Macerated Zone 1
Iron	+	+	-
AtFer1	+	-	-
Intact cell wall	+	+	-
Bacteria	-	-	+

Figure 6 : Comparative table of iron, ferritin, bacteria localization and cell wall integrity in Arabidopsis leaf tissue infected by *D. dadantii*. + means that the element is present. – means that the element is not present. Scale bar: 200µm.

degraded and where the intact zones (labelled with JIM7) co-localize with strong PDH staining (Figure 4). Recently, Hassan et al. (2013) identified a pectate lyase named PelN from *D. dadantii* which has the unusual characteristic of requiring Fe^{2+} as a co-factor for its enzymatic activity and no other cation (among the cations tested). A *pelN* deficient mutant has a reduced virulence on chicory leaves indicating the contribution of this enzyme to the pathogenicity process. These results are in agreement with the presence of high amounts of iron in the plant cell wall. They suggest a possible evolutionary adaptation of PelN to the presence of this element in the close environment of its substrate.

In summary, we show that studying iron localization at the cellular level provides valuable information concerning the role of iron during pathogen attack. Our work highlights the interest of the powerful technique of *in situ* iron staining for the study of a plant microbe interaction at the cellular level. This method is highly specific and easy to set up.



Supplementary Figure 1 : Localization of iron, cell walls and bacteria in an infected Arabidopsis leaf. **A**: Perls-DAB-H₂O₂ staining. **B**: Anti-methylated pectin immunolabeling using JIM7 antibody. Staining is reduced in MZ because of bacterial CWDE activities. **A** and **B** represent the same tissue. Consecutive sections were used in order to be able to co-localize the iron, cell wall integrity and bacterial cells. Scale bar: 50μm. cw : cell wall

Materials and Methods

Plant growth, bacterial culture and inoculation conditions

A. thaliana seeds from the Col-0 accession were obtained from the INRA Versailles collection. The seeds were sown in non-sterile soil and then stratified by incubation for 2 days at 4°C. The resulting seedlings were allowed to grow 5 weeks before inoculation. The 5-week-old plants were heavily watered and covered with a transparent plastic 16 h before inoculation. The cover was kept in place throughout the assay to maintain high-moisture conditions. Plants were subjected to an 8-h light and 16-h dark cycle at 19°C, with 70% relative humidity.

The wild-type strain *D. dadantii* (*E. chrysanthemi* 3937) was isolated from *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (African violet). *D. dadantii* was grown in Luria-Bertani medium (Miller 1972). For plant inoculations, a small hole was made with a needle within the leaf, and then, 5 µl of a bacterial suspension at a density of 5×10^8 C.F.U./mL made up in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) was spotted.

Preparation of tissue for light and electron microscopy

For light microscopy (LM), small fragments of leaves were sampled. For the infected leaves, the samples were chosen when the macerated zone reached stage 2 according to the stages described by Kieu Phuong et al.(2012). This stage corresponds to a maceration zone spanning a circular zone around the inoculation hole of about 3 mm diameter which occurs about 24 hours post inoculation (Figure 2). Samples to be fixed were collected at the boundary between the macerated and the non-macerated zone. Samples were fixed for 3h in a solution consisting of 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.05 M piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid, PIPES) buffer, pH 7.3, under intermittent vacuum. They were washed four times in the same buffer and were dehydrated in a graded ethanol series before embedding in a LR White resin (The London Resin Co., Hampshire, U.K.). For LM, transverse semi-thin (0.5 µm) sections were cut with a diamond knife (Diatome histo, Bienne, Switzerland).

Immunolocalization of bacteria, methyl-esterified homogalacturonans and ferritin

For immunolabelling of cell walls, we used the monoclonal JIM7 antibody made in rats, which specifically recognizes methyl-esterified homogalacturonans (Knox *et al.*, 1990). For immunolabelling of bacteria, we used the anti *D. dadantii* lipo-polysaccharide (LPS) polyclonal antibody made in rabbit (Fagard *et al.*, 2007). For immunolabelling of AtFER1, we used an anti-AtFER1 antibody made in rabbit (Dellagi *et al.*, 2005). See Supplementary Table 1 for the references and experimental details of all the sera used in this study.

Supplementary Table 1

Epitope to be labelled	Serum 1 for saturation	Serum 2	Serum 3
Methyl-esterified homogalacturonans	rabbit	JIM7 in rats, dilution 1:100 (Knox et al., 1990).	Anti rat in rabbit coupled to FITC
AtFER1	goat	Anti AtFER1 in rabbit, dilution 1:700 (Dellagi et al., 2005)	Anti rabbit in goat
<i>D. dadantii</i> LPS	goat	Anti-LPS in rabbit, dilution 1 :10000 (Fagard <i>et al.</i> , 2007).	Anti rabbit in goat

Semithin sections were incubated in TBSB-T buffer (TBSB: 0.05 M Tris HCl buffer pH 7.4 containing 0.9% NaCl, 0.1% BSA and 0.01% Tween 20) for 10 min and then saturated with serum 1 (normal rabbit or goat, see supplementary Table 1) diluted 1/30 in TBSB-T. They were washed (four times for 10 min) and were then incubated overnight at 4°C with the antibody (serum 2) raised against LPS, Pectin or AtFER1 diluted as indicated in supplementary Table 1. After four washes for 10 min with PBSB without Tween, the sections were incubated at room temperature with the labelled antibody (serum 3: anti-rat in rabbit immunoglobulin (IgG) or anti-rabbit in goat IgG, see supplementary Table 1) labeled with fluorescein iso-thiocyanate (FITC) diluted 1:300 in PBSB, in the dark. The slides were washed six times for 10 min each with PBSB, were rinsed with distilled water, and were then mounted in one drop of Vectashield medium. Fluorescence was observed with a Zeiss microscope excitation filter for 450 to 490 nm wavelengths, and barrier filter for 520 nm wavelength). They were then observed with a Zeiss Axiophot light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Histochemical staining of Fe with the Perls-DAB-H₂O₂ procedure

Sections were deposited on glass slides that were incubated for 45 min at room temperature in the Perls stain solution (4% (v/v) HCl and 4% (w/v) K-ferrocyanide). The slides were then washed twice 5 min with distilled water and twice with 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.4. For the intensification reaction the slides were incubated 30 min in the dark in a 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4) solution containing 0.025% (w/v) DAB tetrahydrochloride (Sigma), 0.005% (v/v) H₂O₂, and 0.005% (w/v) CoCl₂. The sections were washed 3 times with distilled water to stop the reaction.

References

- Briat, J.-F., Curie, C. and Gaymard, F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 276-282.
- Briat, J.-F., Duc, C., Ravet, K. and Gaymard, F. (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, **1800**, 806-814.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., *et al.* (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to Erwinia chrysanthemi infection. *Plant Journal*, **43**, 262-272.
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., *et al.* (2009) Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiology*, **150**, 1687-1696.
- Enard, C., Diolez, A. and Expert, D. (1988) SYSTEMIC VIRULENCE OF ERWINIA-CHRYSANTHEMI 3937 REQUIRES A FUNCTIONAL IRON ASSIMILATION SYSTEM. *Journal of Bacteriology*, **170**, 2419-2426.
- Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Perino, C., Rigault, M., Boucher, V., *et al.* (2007) Arabidopsis thaliana expresses multiple lines of defense to counterattack Erwinia chrysanthemi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 794-805.
- Franza, T. and Expert, D. (2013) Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an "a la carte" menu. *Molecular Plant Pathology*, **14**, 429-438.
- Grimault, V., Vian, B., Perino, C., Reis, D. and Bertheau, Y. (1997) Degradation patterns of pectic substrates related to the localization of bacterial pectate-lyases in the model Erwinia chrysanthemi Saintpaulia ionantha. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **51**, 45-62.
- Hassan, S., Shevchik, V. E., Robert, X. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2013) PelN Is a New Pectate Lyase of Dickeya dadantii with Unusual Characteristics. *Journal of Bacteriology*, **195**, 2197-2206.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S. (1996) Regulation of pectinolysis in Erwinia chrysanthemi. *Annual Review of Microbiology*, **50**, 213-257.
- Kim, S. A. and Guerinot, M. L. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Febs Letters*, **581**.
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirrotti, A., Li, L., Alonso, J. M., Ecker, J. R., *et al.* (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, **314**, 1295-1298.
- Knox, J. P., Linstead, P. J., King, J., Cooper, C. and Roberts, K. (1990) PECTIN ESTERIFICATION IS SPATIALLY REGULATED BOTH WITHIN CELL-WALLS AND BETWEEN DEVELOPING-TISSUES OF ROOT APICES. *Planta*, **181**, 512-521.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., *et al.* (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo Journal*, **24**, 4041-4051.
- Lindsay, W. L. and Schwab, A. P. (1982) THE CHEMISTRY OF IRON IN SOILS AND ITS AVAILABILITY TO PLANTS. *Journal of Plant Nutrition*, **5**, 821-840.
- Longnecker, N. and Welch, R. M. (1990) ACCUMULATION OF APOPLASTIC IRON IN PLANT-ROOTS - A FACTOR IN THE RESISTANCE OF SOYBEANS TO IRON-DEFICIENCY INDUCED CHLOROSIS. *Plant Physiology*, **92**, 17-22.
- Maier, R.H.; Cattani, R.A. (1965) Accumulation of iron in higher plant cell walls. *Life Sciences*, **4**, 391-395.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. *Mineral nutrition of higher plants*.
- Marschner, H., Romheld, V. and Kissel, M. (1986) DIFFERENT STRATEGIES IN HIGHER-PLANTS IN MOBILIZATION AND UPTAKE OF IRON. *Journal of Plant Nutrition*, **9**, 695-713.
- Morrissey, J. and Guerinot, M. L. (2009) Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. *Chemical Reviews*, **109**, 4553-4567.
- Munzinger, M., Budzikiewicz, H., Expert, D., Enard, C. and Meyer, J. M. (2000) Bacterial constituents. Part LXXXIX - Achromobactin, a new citrate siderophore of Erwinia chrysanthemi. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, **55**, 328-332.
- Murdoch, L., Corbel, J. C., Reis, D., Bertheau, Y. and Vian, B. (1999) Differential cell wall degradation by Erwinia chrysanthemi in petiole of Saintpaulia ionantha. *Protoplasma*, **210**, 59-74.
- Nikolic, M. and Romheld, V. (2007) The dynamics of iron in the leaf apoplast: significance for the iron nutrition of plants. In: *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions. The significance of the apoplast for the mineral nutrition of higher plants*. (Sattelmacher, B. and Horst, W. J., eds.). Heidelberg, Germany: Springer-Verlag GmbH.
- Nouet, C., Motte, P. and Hanikenne, M. (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends in Plant Science*, **16**, 395-404.

- Persmark, M., Expert, D. and Neilands, J. B. (1989) ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND SYNTHESIS OF CHRYSOBACTIN, A COMPOUND WITH SIDEROPHORE ACTIVITY FROM ERWINIA-CHRYSANTHEMI. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 3187-3193.
- Pierre, J. L. and Fontecave, M. (1999) Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals*, **12**, 195-199.
- Reverchon, S. and Nasser, W. (2013) Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environmental Microbiology Reports*, **5**, 622-636.
- Roschztardt, H., Conejero, G., Curie, C. and Mari, S. (2010) Straightforward histochemical staining of Fe by the adaptation of an old-school technique: identification of the endodermal vacuole as the site of Fe storage in Arabidopsis embryos. *Plant signaling & behavior*, **5**.
- Roschztardt, H., Grillet, L., Isaure, M. P., Conejero, G., Ortega, R., Curie, C., *et al.* (2011) Plant Cell Nucleolus as a Hot Spot for Iron. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 27863-27866.
- Santos, R., Franza, T., Laporte, M. L., Sauvage, C., Touati, D. and Expert, D. (2001) Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of Erwinia chrysanthemi strain 3937. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 758-767.
- Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., *et al.* (2009) NRAMP genes function in Arabidopsis thaliana resistance to Erwinia chrysanthemi infection. *Plant Journal*, **58**, 195-207.
- Ye F, Albarouki E, Lingam B, Deising HB, von Wirén N. (2014) An adequate Fe nutritional status of maize suppresses infection and biotrophic growth of Colletotrichum graminicola. *Physiol Plant*. [Epub ahead of print].

CHAPITRE V

**ETUDE DE L'IMPACT DU STATUT EN FER D'A.
THALIANA AU COURS DE L'INTERACTION AVEC *D.*
DADANTII ET *B. CINEREA***

CHAPITRE V : ETUDE DE L'IMPACT DU STATUT EN FER D'*A. THALIANA* **AU COURS DE L'INTERACTION AVEC *D. DADANTII* ET *B. CINEREA***

Préambule

Les résultats obtenus au laboratoire ont montré qu'en réponse à l'infection par *D. dadantii*, *A. thaliana* met en place des réponses de défense qui requièrent les protéines AtFER1 et NRAMP3, assurant respectivement le stockage du fer dans le chloroplaste et le transport du fer vacuolaire vers le cytosol (Dellagi et al., 2005; Segond et al., 2009). De plus, l'infection conduit à l'induction du système d'acquisition du fer racinaire, c'est à dire une augmentation du niveau d'expression des gènes *FRO2* et *IRT1* (Segond et al., 2009).

Afin de déterminer si le statut en fer d'*A. thaliana* affecte la mise en place de ses réponses de défenses et affecte l'agressivité de la bactérie *D. dadantii*, l'interaction a été étudiée sur des plantes carencées ou des plantes cultivées dans des conditions optimales d'apport en fer. L'interaction avec le champignon *B. cinerea*, un autre agent pathogène nécrotrophe, a également été étudiée dans ces conditions de nutrition en fer de la plante.

Ma contribution à cette étude a consisté à participer à l'étude des symptômes causés par *D. dadantii*, à l'observation et la quantification de l'accumulation de callose et de H₂O₂ en réponse à l'infection par *D. dadantii*, sur des plantes contrôle et des plantes en état de carence ferrique.

Ces résultats sont présentés sous la forme de l'article " Iron deficiency affects plant defense responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and to *Botrytis cinerea* ", publié dans le journal "Molecular Plant Pathology".

Title of the manuscript: Iron deficiency affects plant defense responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and to *Botrytis cinerea*

Authors:

Nam Kieu Phuong^{2*}, Aude Aznar¹, Diego Segond, Martine Rigault¹, Elizabeth Simond-Cotte¹, Caroline Kunz¹, Marie-Christine Soulie¹, Dominique Expert¹, Alia Dellagi^{*1}

Corresponding author: Alia Dellagi

Address:

¹Laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes UMR217 INRA/AgroParisTech/UPMC, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris cedex 05 France

²Department of Plant biotechnology and biotransformation, Faculty of Biology, University of Science Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu, District 5, Ho Chi Minh city, Vietnam

*Present address: Laboratory of Phytopathology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure Links, 653, B-9000 Ghent, Belgium

Phone: +33 1 30 83 32 40

E-mail: dellagi@agroparistech.fr

Summary

Iron is an essential element for most living organisms, and pathogens are likely to compete with their host for the acquisition of this element. The bacterial plant pathogen *Dickeya dadantii* was shown to require its siderophore mediated iron uptake systems for systemic disease progression on several host plants including *Arabidopsis thaliana*. In this study, we have investigated the effect of *Arabidopsis* iron nutrition on the severity of disease caused by *D. dadantii*. We show that symptom severity, bacterial fitness and expression of bacterial pectate lyase encoding genes are reduced in iron deficient plants. Reduced symptoms correlated with enhanced expression of the salicylic acid defense plant marker gene *PR1*. However levels of the ferritin coding transcript *ATFER1*, callose deposition and production of reactive oxygen species were reduced in iron deficient infected plants ruling out the involvement of these defenses in the limitation of disease caused by *D. dadantii*. Disease reduction in iron starved plants was also observed with the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. Our data demonstrate that the plant nutritional iron status can control the outcome of an infection by acting both on the pathogen's virulence and the host's defense. In addition, iron nutrition strongly affects disease caused by two large host range, soft rot causing plant pathogens. Thus, it might be interesting to consider the plant iron growth when there is a need to control disease on economically important crops.

Introduction

Acting as a catalyst in many metabolic processes such as respiration and photosynthesis, iron is essential for growth of almost all organisms. Despite its high abundance in the earth's crust, its availability in aerobic and alkaline soils is poor because it is generally present in the form of insoluble ferric hydroxides. About 30% of croplands are too alkaline for optimal crop growth (Marschner, 1995). The more soluble ferrous form can generate with oxygen noxious reactive oxygen species (ROS) through the Fenton reaction (Pierre & Fontecave, 1999). Therefore, cellular iron acquisition, utilization and storage are subject to different levels of homeostatic regulation.

Plants use two strategies to acquire iron from the soil (Römheld and Marschner, 1986, reviewed in Briat). The so called "strategy I" described in non graminaceous species, involves a reduction mechanism. The plant copes with iron deficiency by increasing root H⁺-ATPase activity and secreting organic acids that lower the rhizospheric pH and increase its solubility. Soluble ferric ions are reduced at the plasma membrane, through the activity of an iron deficiency-inducible root ferric-chelate reductase. In *A. thaliana*, FRO2 was identified as the major root iron-chelate reductase (Robinson *et al.*, 1999) and the reduced iron is taken up by the root iron regulated transporter IRT1 (Eide *et al.*, 1996). The metal is internalized in the root epidermis and cortex, and then mobilized to the aerial parts through the vascular system. Strategy II, based on iron chelation, is used by *Poaceae* which secrete phytosiderophores that bind ferric iron in the root medium. The Fe-phytosiderophore complexes are specifically recognized by a high affinity transporter (Kobayashi *et al.*, 2010) belonging to the YS1 family, and iron is internalized into the root. Inside the plant, iron is transported essentially as Fe-citrate and Fe-nicotianamine complexes (Briat *et al.*, 2007, Morrissey & Guerinot, 2009). Storage and buffering in dedicated compartments including apoplast and organelles (vacuole, plastids) protect the cell from iron toxicity (Briat *et al.*, 2007, Morrissey & Guerinot, 2009). In plastids, ferritins represent the major iron-containing proteins. In *A. thaliana*, the ferritins AtFER1-4 are mainly involved in buffering iron and protecting the plant cells against oxidative stress (Ravet *et al.*, 2009). Loading iron in vacuolar stores is mediated by VIT1 (Kim *et al.*, 2006) and iron mobilization from the vacuole to the cytosol is mediated by the divalent metal transporters AtNRAMP3 and AtNRAMP4 during seedling development (Lanquar *et al.*, 2005).

Besides the physical properties of soils, biotic factors have some impact on iron availability to plants (Lemanceau *et al.*, 2009). Plants interact with a variety of micro-organisms that, like grasses, produce siderophores which are secreted in response to iron deficiency (Andrews *et al.*, 2003, Winkelmann, 2007). Iron-siderophore complexes are specifically recognized and transported across the microbial cell envelope providing the micro-organism with iron. Microbial siderophores can exert

a beneficial effect on plant growth because they significantly increase the solubility of iron in the soil. However, most of them display a higher affinity for this metal than phytosiderophores and other plant iron carriers, and consequently iron can be a stake in competitive relationships between plants and micro-organisms. In plant-pathogen interactions, the production of siderophores by the pathogen is an efficient mechanism to acquire iron in the host and to promote infection (Expert, 1999, Haas *et al.*, 2008).

Dickeya dadantii is an enterobacterium which causes soft rot on a large host range of plant species. It causes economically important damages on different crops including potatoes, chicory and ornamentals like *Saintpaulia ionantha* (Perombelon, 2002, Toth *et al.*, 2003). Bacterial cells invade the intercellular spaces of parenchymatous tissues and secrete large quantities of plant cell wall degrading enzymes leading to tissue disorganization (Murdoch *et al.*, 1999, Fagard *et al.*, 2007). Under iron deficiency, *D. dadantii* releases two siderophores: the hydroxycarboxylate achromobactin which is produced when iron becomes limiting (Munzinger *et al.*, 2000) and the catecholate chrysobactin (Persmark *et al.*, 1989) which prevails under severe iron deficiency. Chrysobactin and achromobactin production are required for the systemic progression of maceration symptoms on the hosts (Franza *et al.*, 2005, Enard *et al.*, 1988, Dellagi *et al.*, 2005). In *A. thaliana*, the genes encoding the iron storage protein ferritin *AtFER1*, and the vacuolar metal transporters *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4*, are involved in basal resistance to *D. dadantii*, indicating that changes in plant iron trafficking occur during infection (Dellagi *et al.*, 2005, Segond *et al.*, 2009). In addition, following *D. dadantii* inoculation, both plant iron deficiency markers *IRT1* and *FRO2* are up-regulated indicating that enhanced iron acquisition by the plant occurs upon infection (Segond *et al.*, 2009).

In the present work, we were interested to know whether the plant iron nutrition was likely to influence the development of the disease caused by this pathogen on *Arabidopsis* plants. We show that in plants grown under low iron conditions, this metal is the essential factor limiting the development of *D. dadantii*. The reduced progression of disease symptoms observed on iron starved plants correlates with reduced expression of major bacterial virulence genes. We analyzed the defense reactions known to be activated in *A. thaliana* in response to *D. dadantii* infection in relation with the plant iron nutrition. We concluded that the decreased susceptibility of iron starved plants to disease is due to the low plant iron content rather than to a general amplification of defense responses to the pathogen. We

found that iron deficiency in *A. thaliana* also decreases the incidence of the grey mold disease caused by the fungus *Botrytis cinerea*. These data highlight the existence of a link between plant iron nutrition and susceptibility/resistance to microbial disease.

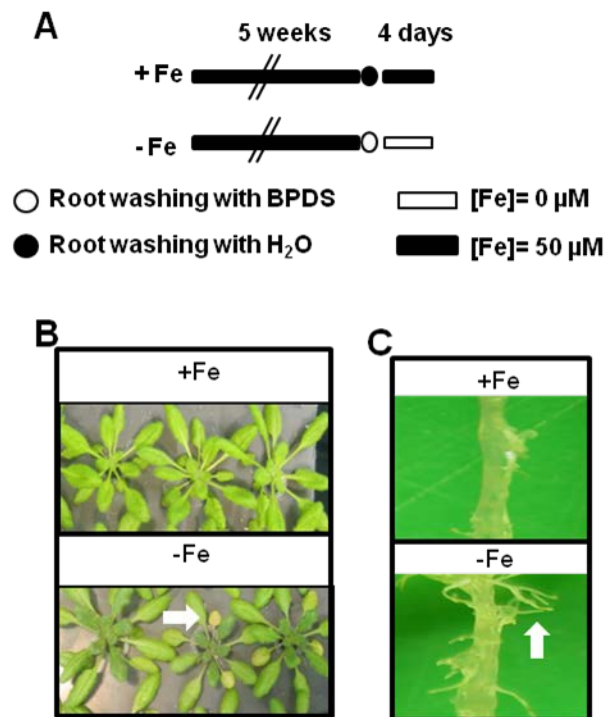


Fig.1 : Iron deficiency triggered phenotypic modifications in Arabidopsis plants. (A): Growth conditions for +Fe and –Fe plants. Arabidopsis plants were grown for 5 weeks in a 50 μM Fe-EDTA containing nutritional solution then roots were washed with distilled water or BPDS as indicated. Next, plants were transferred in fresh nutritional solution with (+Fe) or without (–Fe) 50 μM Fe-EDTA during 4 days. **(B):** Pictures of Arabidopsis plants in +Fe and –Fe at the same scale. Chlorotic leaves are indicated (white arrow). **(C):** Pictures of roots from +Fe and –Fe plants. Secondary roots are indicated in –Fe plants (white arrow).

Results

Effect of iron starvation in *Arabidopsis* on the disease caused by *D. dadantii*

For studying the effect of plant iron nutrition on microbial infection, we used the hydroponic system described previously (Segond et al., 2009). In order to obtain plants with reduced iron content, without affecting plant size, we first grew plants under iron-replete conditions (50 μ M FeEDTA, Fig. 1A) for 5 weeks. Then, iron deficiency was achieved by root washing with bathophenanthroline disulfonate, followed by transfer to iron-depleted medium. Four days later, the plants displayed typical iron deficiency symptoms: leaf chlorosis and presence of a higher number of secondary roots (Fig. 1B, C). These plants were referred to as " -Fe plants ". Control plants were grown for 6 weeks in the presence of 50 μ M Fe-EDTA. They were referred to as " +Fe plants ". Iron content was found to be reduced by 30% in -Fe leaves (61 \pm 1.41 μ g / g of dry weight (DW)) compared to + Fe leaves (90 \pm 8.3 μ g / g DW). Under these conditions, leaves of +Fe and -Fe plants have almost the same size (Fig. 1).

We compared the severity of symptoms caused by *D. dadantii*, after inoculation of +Fe and -Fe plants. Symptom severity was scored over 6 days using the scale presented on Fig. 2B. We observed a delay in the development of symptoms in -Fe compared to +Fe plants (Fig. 2C) visible after 2 days post-inoculation (p.i.). Accordingly, we found reduced bacterial growth in -Fe plants (Fig. 2D), whereas almost no growth occurred during the first 24 h p.i. After that, the number of bacterial counts increased, but it always remained lower than that observed in +Fe plants. These data led us to consider that the pathogenicity of *D. dadantii* on iron starved plants was affected.

Iron re-supply to iron starved plants restores *D. dadantii* pathogenicity

To know whether iron availability was the main factor limiting the infection process, we re-supplied -Fe plants with iron after bacterial inoculation. Symptom evolution on these plants was compared to that observed on -Fe and +Fe plants. For this purpose, +Fe and -Fe plants were inoculated as shown in Fig. 2. Twenty four hours after inoculation, -Fe plants were transferred to the iron containing medium. These plants were referred to as " -Fe/+Fe ". To rule out a possible mechanical stress effect during the transfer, control experiments consisted of +Fe and -Fe plants inoculated and transferred 24 h p.i. to the same +Fe and -Fe media, respectively. The data (Fig. 3) indicate that, in +Fe plants, the disease intensity increased over time. Symptoms of stage 4 were apparent in approximately 75% of inoculated plants, 6 days p.i. In -Fe plants, the intensity of the symptoms was significantly reduced, but iron re-supply reversed this effect: a complete rescue was observed at day 6 p.i. Thus, iron availability in iron starved plants is a limiting factor for the development of the infection process.

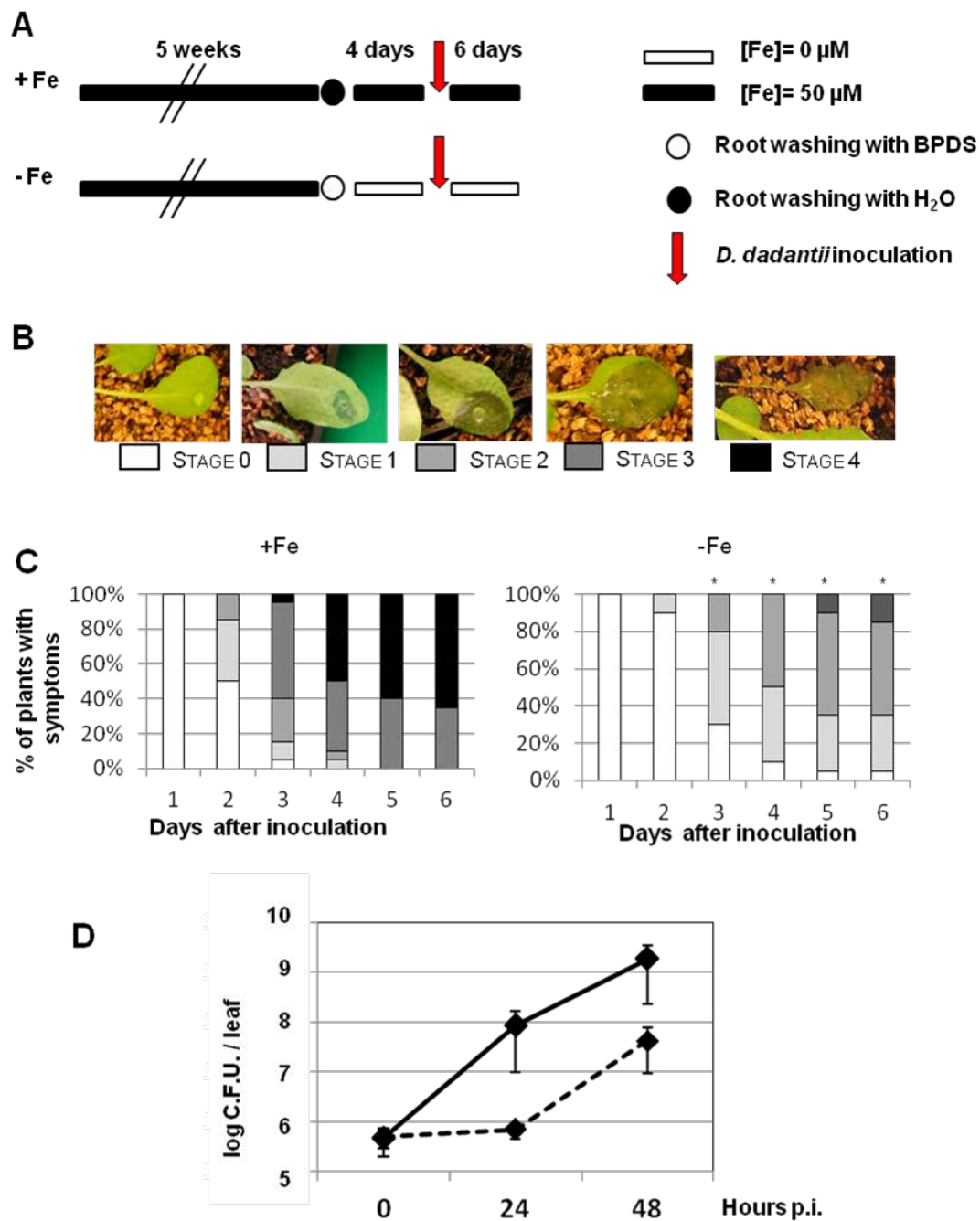


Fig.2 : Effect of iron deficiency on disease development and *D. dadantii* growth in Arabidopsis plants. (A): Experimental design for +Fe and –Fe plants (see Fig. 1). Leaves were inoculated with a 10^7 C.F.U./ mL *D. dadantii* bacterial suspension and symptoms were scored for 6 days. **(B):** Symptom severity scale: Stage 0 = no symptom; Stage 1 = maceration at the site of inoculation; Stage 2 = maceration covering about half of the leaf, Stage 3 = maceration covering the whole leaf, and Stage 4 = maceration has spread to the rest of the plant. **(C):** Disease severity on +Fe and –Fe plants scored at indicated times after inoculation. Data are representative of 4 independent experiments with 24-30 plants in each experiment. Asterisks indicate significant difference in symptom severity calculated with Fisher exact test ($p<0.05$) **(D):** Bacterial populations of *D. dadantii* at indicated times after inoculation in +Fe plants (filled lines) and –Fe plants (dotted lines). Bars=SE

Effect of plant iron nutrition on expression of *D. dadantii* pectate lyase encoding genes

In *D. dadantii*, pectate lyase isoenzymes PelA to PelD are major determinants of symptom production on host plants. In planta detection of bacterial *pel* gene expression by RT-PCR was previously described on soil grown seedlings during the first 24 hours p.i. (Kraepiel *et al.*, 2011, Lebeau *et al.*, 2008). As the symptom severity was reduced in -Fe plants, we suspected that this could be due to changes in the transcriptional activity of corresponding pectate lyase encoding genes, *pelA* to *pelD*. To test this possibility, plants were grown and infected as indicated in Fig. 2. Leaves from +Fe and -Fe plants were infiltrated with a 10^7 C.F.U./mL bacterial suspension and were harvested at 3, 7, 10 and 24 h p.i. Relative expression of *pelA*, *pelB*, *pelC* and *pelD* genes was monitored by q-RT-PCR and normalized against the reference gene *rpoB*. Fold induction of *pel* gene expression in +Fe relative to -Fe plants was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Expression of *pelA*, *pelB*, *pelC* and *pelD* genes is similar in +Fe and -Fe plants, until 7 h p.i. (Fig. 4). After 10 h, there was an increase in the expression levels of *pelB*, *pelC* and *pelD* genes in +Fe plants, only. This increase was transient and after 24 h, their expression levels were similar in both +Fe and -Fe plants. The expression of *pelA* gene remained unchanged during the experiment. Thus, there is a direct correlation between the expression levels of *pel* genes, the amount of symptoms and bacterial growth, indicating a reduction in the bacterial virulence when plants are iron starved.

Effect of plant iron nutrition on expression of *Arabidopsis* defense genes

The decreased virulence of *D. dadantii* observed on iron starved plants could result from enhanced plant resistance. To investigate this possibility, we analyzed the expression of defense genes, *PR1*, *CHIB* and *AtFER1*, known to be up-regulated in *A. thaliana* during the first 24 h following *D. dadantii* infection (Fagard *et al.*, 2007, Dellagi *et al.*, 2005). The *PR1* and *CHIB* genes are respectively representative of the salicylic acid (SA) and ethylene/jasmonic acid (Et/JA) dependant signaling pathways that mediate plant defense (Glazebrook, 2005). The *AtFER1* gene encodes a plastidial ferritin involved in the basal resistance to *D. dadantii* (Dellagi *et al.*, 2005). Leaves from +Fe and -Fe plants were infiltrated with a 10^7 C.F.U./mL bacterial suspension or with 10 mM $MgSO_4$ as a control. RNAs were extracted from infected and control leaves at 3, 10 and 24 h post-infection and the expression of defense genes was monitored by q-RT-PCR. In +Fe as well as in -Fe plants, we observed the up-regulation of the 3 genes at 24 h p.i. However in -Fe plants, the transcript level of *PR1* was two times higher and that of *AtFER1* was four times lower, than that measured in +Fe plants (Fig. 5). Thus, these data indicate that there is no strict correlation between the expression levels of these defense genes and the reduced disease severity observed in -Fe plants.

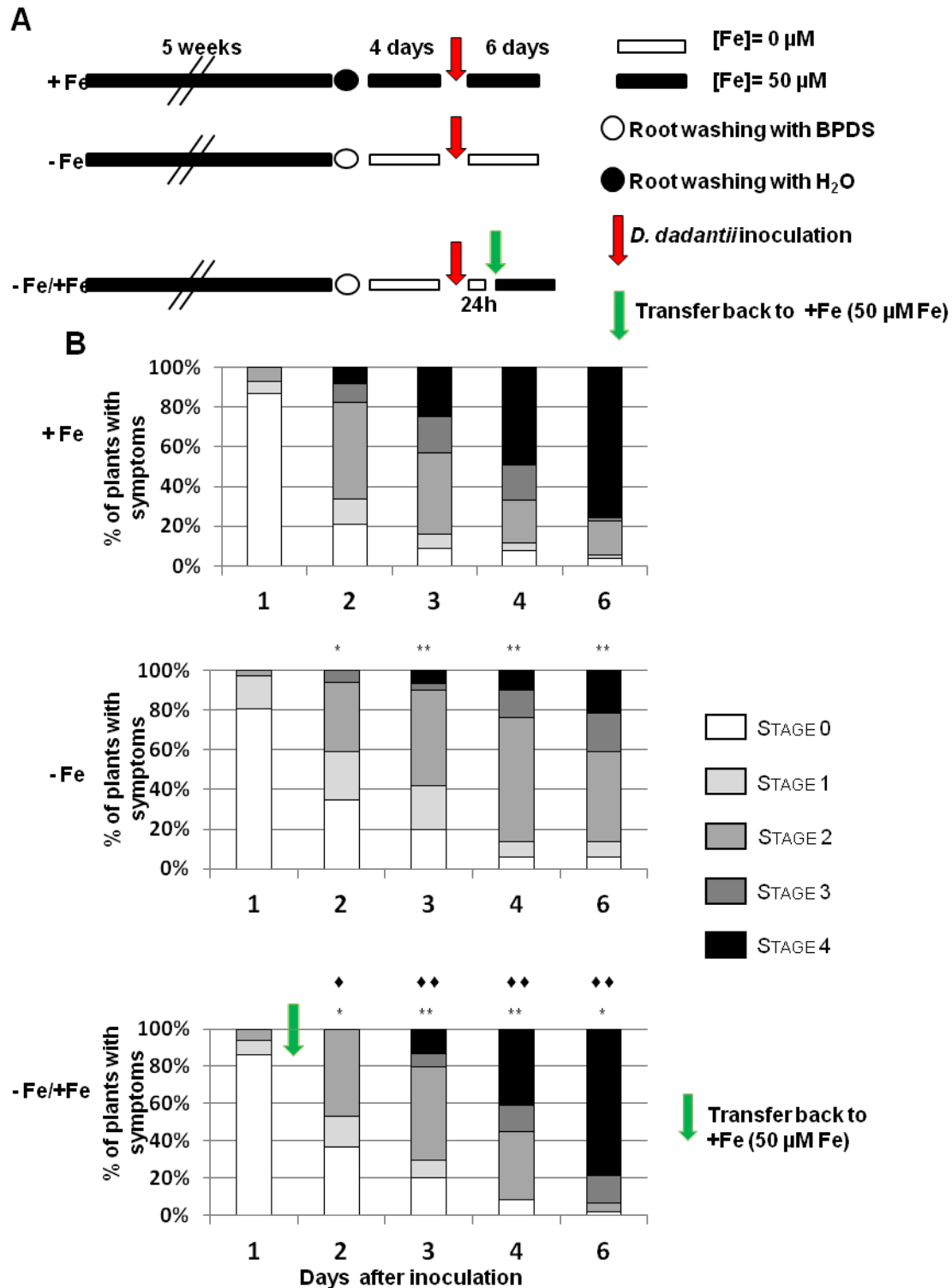


Fig. 3 : Effect of iron re-supply on *D. dadantii* disease development in *Arabidopsis* iron starved plants. (A): Experimental design for +Fe, -Fe and -Fe/+Fe plants. Leaves were inoculated with a 10^7 C.FU./ mL *D. dadantii* bacterial suspension. To investigate the effect of iron on disease progression, -Fe plants were re-supplied with 50 μ M Fe-EDTA 24 hours after bacterial inoculation (designated -Fe/+Fe) by transfer to iron sufficient medium (green arrow). (B): Disease severity on +Fe, -Fe and -Fe/+Fe plants scored at indicated times after inoculation. Asterisks indicate significant difference in symptom severity compared to +Fe plants at the same time point calculated by Fisher exact test (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$). Diamonds indicate significant difference in symptom severity compared to -Fe plants at the same time point calculated by Fisher exact test (♦ : $p < 0.05$; ♦♦ : $p < 0.01$). Data are representative of 3 independent experiments with 24-30 plants in each experiment.

Effect of plant iron nutrition on callose deposition following infection

Callose deposition is a plant immunity marker used to study the plant response to Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) or to virulence promoting pathogen effectors (Luna *et al.*, 2011). Inoculation of *D. dadantii* in Arabidopsis leaves triggers strong callose deposition mainly around the leaf vascular system (Fagard *et al.*, 2007). Leaves from +Fe and –Fe plants were infiltrated with a 10^7 C.F.U./mL bacterial suspension or with 10 mM MgSO_4 as a control. We monitored callose deposition by blue aniline staining, 8 h following infection. Fig. 6A and 6B show that callose deposits accumulated to a level significantly higher in *D. dadantii* infected leaves of +Fe plants compared to –Fe plants. Interestingly, in –Fe plants, bacterial infection did not trigger callose deposition. In addition, the background level of callose deposition observed on MgSO_4 treated leaves seemed to be reduced in leaves from –Fe Arabidopsis plants. These data suggest that iron limitation results in reduced callose deposition in healthy and infected Arabidopsis plants. Thus, although –Fe plants displayed reduced susceptibility to *D. dadantii* compared to +Fe plants, this cannot be linked to increased callose deposition.

Effect of plant iron nutrition on reactive oxygen species accumulation following infection

A strong oxidative burst is generated in *A. thaliana* during the first 24 h following infection by *D. dadantii* and this reaction constitutes an effective defense towards the bacterium (Fagard *et al.*, 2007). This burst was shown to result mainly from the activity of the NADPH oxidase AtRbohD. As iron can also generate ROS in aerobic environments (Pierre & Fontecave, 1999), we investigated the level of ROS production following bacterial infection in +Fe and –Fe plants. The fluorescent dye 2'-7' dichlorofluoresceine-diacetate (DCFH-DA) was used to detect intracellular hydrogen peroxide as an indicator of ROS production. Leaves from +Fe and –Fe plants were infiltrated with a 10^7 C.F.U./mL bacterial suspension or with 10 mM MgSO_4 as a control. The fluorescence was monitored at the time point 16 h p.i. (Fig. 6C and 6D). A significantly higher fluorescence was observed on the leaves infiltrated with the bacterial suspension in +Fe leaves compared to –Fe leaves. No increase in fluorescence was observed in –Fe leaves following bacterial treatment compared to the control. These results indicate that the flux of nutritional iron in the plant could contribute to the production of ROS in response to *D. dadantii*. Thus, although –Fe plants displayed reduced susceptibility to *D. dadantii* compared to +Fe plants, this cannot be linked to increased accumulation of ROS.

Effect of iron deficiency in Arabidopsis on the disease caused by *Botrytis cinerea*

We were interested to know whether reduced symptom severity caused by iron deprivation was specifically occurring against the bacterial pathogen *D. dadantii*. To address this point, we chose

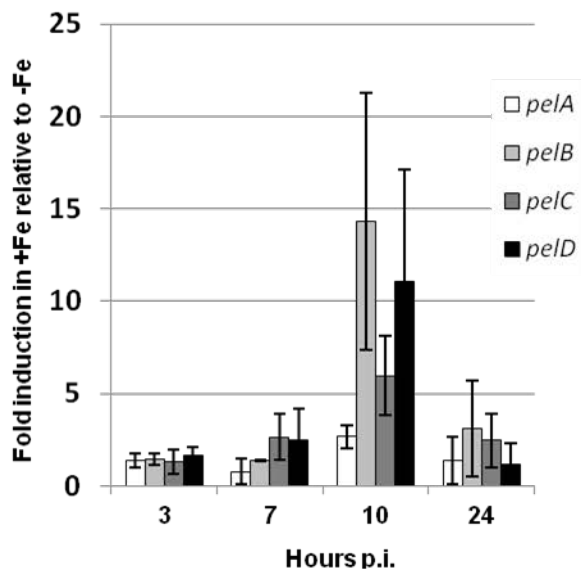


Fig. 4 : Effect of Arabidopsis iron nutrition on expression of *D. dadantii* pectinase genes in planta. Plants were grown under -Fe or +Fe conditions and inoculated with a 10^7 C.FU./mL *D. dadantii* bacterial suspension as indicated in Fig. 2. Leaves were harvested at indicated times after inoculation. Relative expression of indicated pectate lyase genes was monitored by q-RT-PCR and is expressed as fold induction in +Fe inoculated plants relative to -Fe inoculated plants. Data are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ with the endogenous reference gene *rpoB*. Bars=SE, n=3 independent biological experiments.

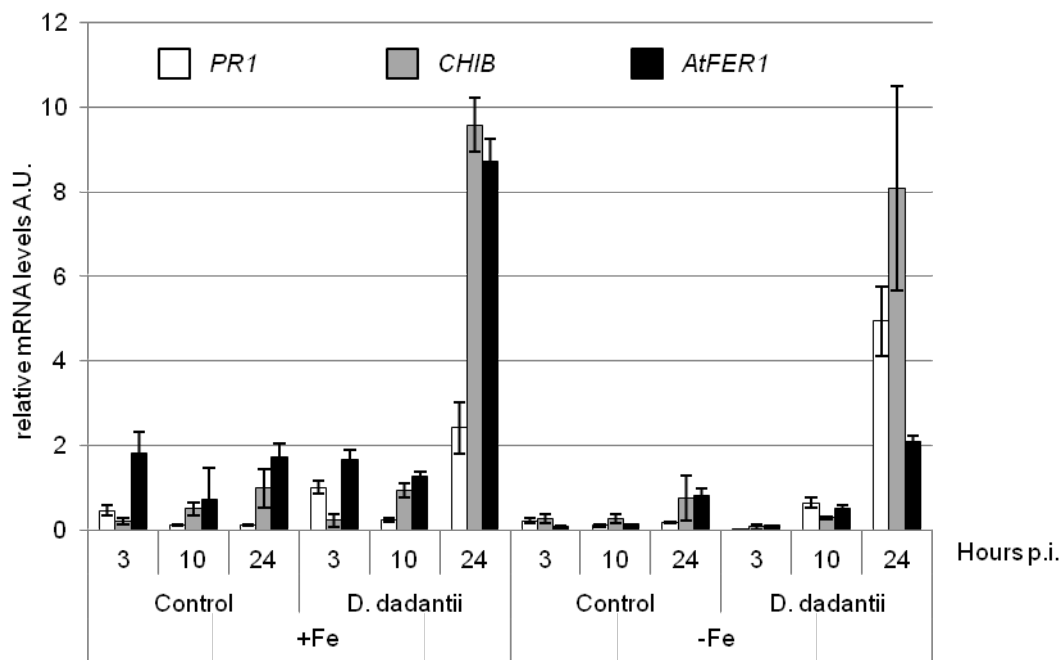


Fig. 5 : Effect of Arabidopsis iron nutrition on expression of defense genes in response to *D. dadantii*. Plants were grown under -Fe or +Fe conditions as indicated in Fig. 2. Relative transcript levels of indicated Arabidopsis defense genes were monitored in control plants inoculated with 10mM $MgSO_4$ and in plants inoculated with a 10^7 C.FU./mL *D. dadantii* bacterial suspension. Leaves were harvested at indicated times after inoculation and gene expression was assayed by q-RT-PCR relatively to the internal control *EF1 α* transcript level. Bars=SE, n=3 technical repeats. Data are representative of two independent experiments.

another microbial plant pathogen, the ascomycete *Botrytis cinerea* which shares several characteristics with *D. dadantii*: i) it causes maceration symptoms owing to a large amount of plant cell wall degrading enzymes, ii) it infects a large host range of plant species. We then investigated the effect of plant iron nutrition on the disease caused by this fungus. We grew +Fe and -Fe plants and inoculated excised leaves with *B. cinerea* mycelium plugs. Lesion surfaces were scored on each leaf over 4 days. Fig. 7B shows that the macerated surfaces increased over time in leaves from +Fe and -Fe plants. However, from 72 h p.i. onwards, leaves from -Fe plants displayed significantly smaller lesions. This indicates that in the same way as for *D. dadantii*, severity of the disease caused by *B. cinerea* is reduced in iron starved plants. We further investigated whether *B. cinerea* strain BO 5.10 growth was affected under iron limitation, by analyzing the growth of the mycelium in a minimal medium amended with iron or not. Fig. 8A shows that iron starvation resulted in a 3 fold growth decline after 5 days of culture. Fig. 8B shows that iron limitation resulted in the production of three times higher levels of siderophores as detected by the CAS assay. These data indicate that *B. cinerea* strain BO 5.10 responds to low iron with reduced growth and increased siderophore production. Thus, lack of nutritional iron in -Fe plants could cause reduced disease provoked by *B. cinerea* in *A. thaliana*.

Discussion

In plants, as in humans and other animals, the availability of iron is one of the factors that may limit the growth of pathogenic microorganisms within the host. Though the role of high-affinity iron uptake systems in the virulence of plant pathogens begins to be well documented, the role of plant iron nutrition *per se* on the susceptibility to disease has only been investigated in a few cases (Guerra and Anderson, 1985; Macur et al., 1991). In this work, we explored this question on the model plant *A. thaliana*. As discussed below, we found that the plant iron status influences the microbial fitness as well as reactions of the plant basal immunity in a complex way. Using the pathogens *D. dadantii* and *B. cinerea*, we show that conditions favorable to plant thriving are also greatly beneficial to the pathogen.

To analyze the effects that plant iron nutrition may exert on the susceptibility to pathogens, we devised a protocol on *A. thaliana* plants displaying similar sizes allowing relevant comparisons between +Fe and -Fe conditions. This enabled us to show that plants exposed to iron deficiency are less susceptible to disease caused by *D. dadantii* and *B. cinerea*. To explain this effect, we focused our analysis on the *D. dadantii*-*A. thaliana* pathosystem and considered three explanations, which are

b

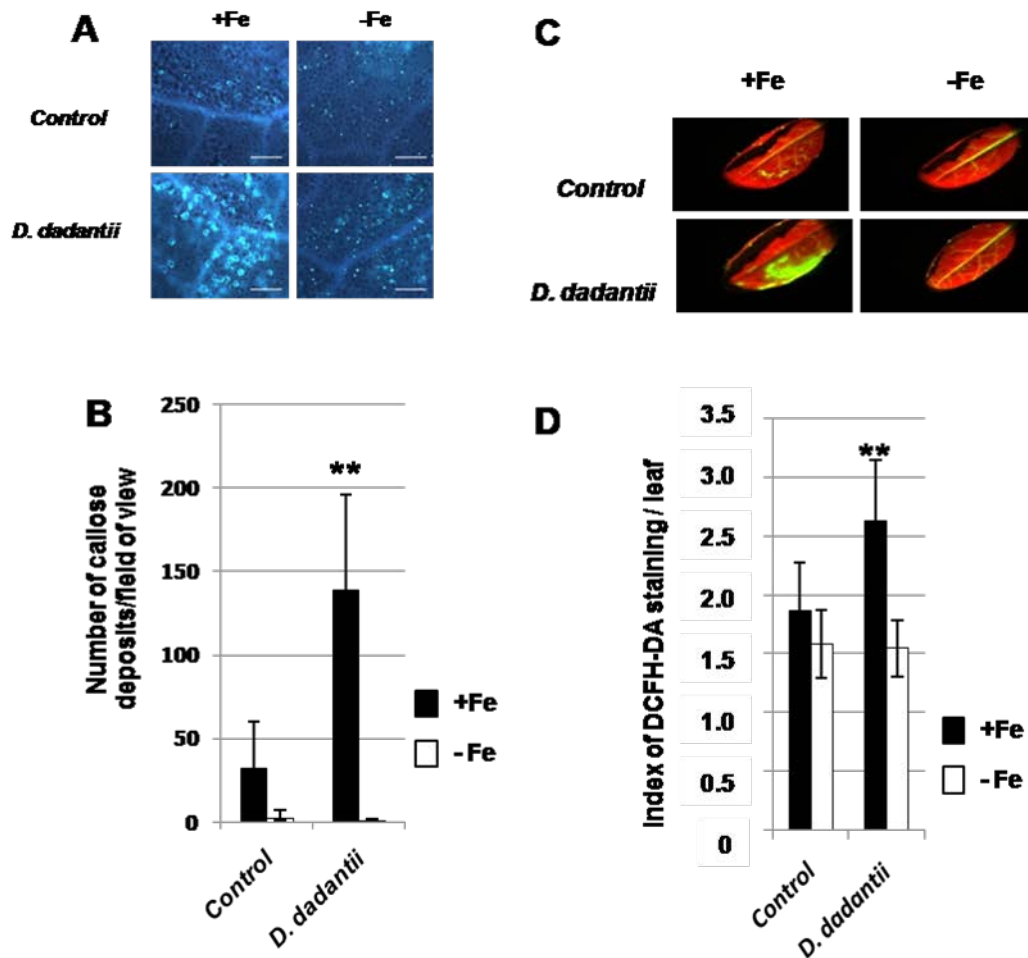


Fig. 6: Impact of iron nutrition on callose deposition and oxidative stress in response to *D. dadantii*. Control leaves were infiltrated with 10mM MgSO₄ and *D. dadantii* inoculated leaves were infiltrated with a 10⁷ C.FU. /mL bacterial suspension.

(A): Picture of callose depositions detected with aniline blue staining in leaves 8 h after the indicated treatments. Bar = 200 μ m. (B): Numbers of callose depositions per unit of leaf surface were quantified using the ImageJ software. n=18 leaves (C): Picture of hydrogen peroxide staining in Arabidopsis leaves with the fluorescent dye DCFH-DA 16 h after indicated treatments. (D): Quantification of H₂O₂ mediated fluorescence as index of grey pixels/leaf. Bars=SE, n=18 leaves. Asterisks indicate statistically significant difference between +Fe and -Fe in response to *D. dadantii* (Mann and Whitney, $p < 0.01$). Data are representative of 3 independent experiments.

not mutually exclusive: i) *in planta* bacterial growth is limited by low iron availability, ii) bacterial virulence is reduced and iii) plant defense is increased in iron starved plants.

Indeed, in iron starved plants, symptom spreading and bacterial growth were greatly reduced within the first 24 h of infection by *D. dadantii*, suggesting that the reduced mobilization of nutritional iron from the root to aerial parts of the plant results in reduced bacterial fitness due to decreased iron availability in the leaf. This view is in agreement with the fact that high-affinity iron acquisition systems like the production of siderophores is required by *D. dadantii* to cause systemic infections on its hosts (Enard et al., 1988, Dellagi et al., 2005, Franza et al., 2005). In addition, in iron starved plants we found a reduced expression of the genes encoding pectate lyases which are the major virulence factors of *D. dadantii*. The reduced expression of these genes must result in a lower production of the corresponding enzymes, and thus in reduced bacterial growth and invasiveness. Moreover, the reduced expression of these genes could be the result from a physiological trade off in bacterial cells which encounter stress conditions in iron starved plants. Interestingly, by re-supplying iron starved plants with iron, we were able to restore the symptom severity to a level almost similar to that observed on non starved plants, thus indicating that iron in the root medium acts as a limiting factor of the infection process. Iron re-supply must result in an uptake of this metal by the plant, thus rescuing bacterial growth and expression of virulence genes.

We show that in *A. thaliana*, the iron nutrition has some impact on defense reactions activated in response to *D. dadantii*. It is noteworthy that in iron starved plants the defenses known to be effective against this bacterium (Fagard et al., 2007) are unaffected as it is the case for the ethylene/jasmonate mediated response, or strongly reduced as it is the case for callose and ROS production. It seems clear that these defenses do not contribute to the increased resistance against *D. dadantii* in iron starved plants. The reduced production of ROS in such plants may result from the fact that iron is required for the formation of ROS through the Fenton reaction (Pierre & Fontecave, 1999). In addition, iron is needed for the activity of several ROS generating enzymes which are heme dependant, like NADPH-oxidases (AtRbohD and AtRbohF) and peroxidases (Mittler *et al.*, 2011). Thus, it is very likely that the production of ROS following infection is hindered because iron levels are reduced. The reduced callose apposition following *D. dadantii* infection in iron starved plants could be related to low ROS production. This assumption is supported by the fact that callose depositions in response to the bacterial plant defense elicitors, flagellin derived peptide Flg22 (Luna et al., 2011), and oligogalacturonides (Galletti *et al.*, 2008), are dependent on ROS production. The up-regulation of the *AtFER1* gene in response to *D. dadantii* infection is also affected in iron starved plants. Very likely, this effect results from the low levels of ROS and iron, as these two factors are known to control the transcriptional expression of the *AtFER1* gene (Gaymard *et al.*, 1996, Petit *et al.*, 2001).

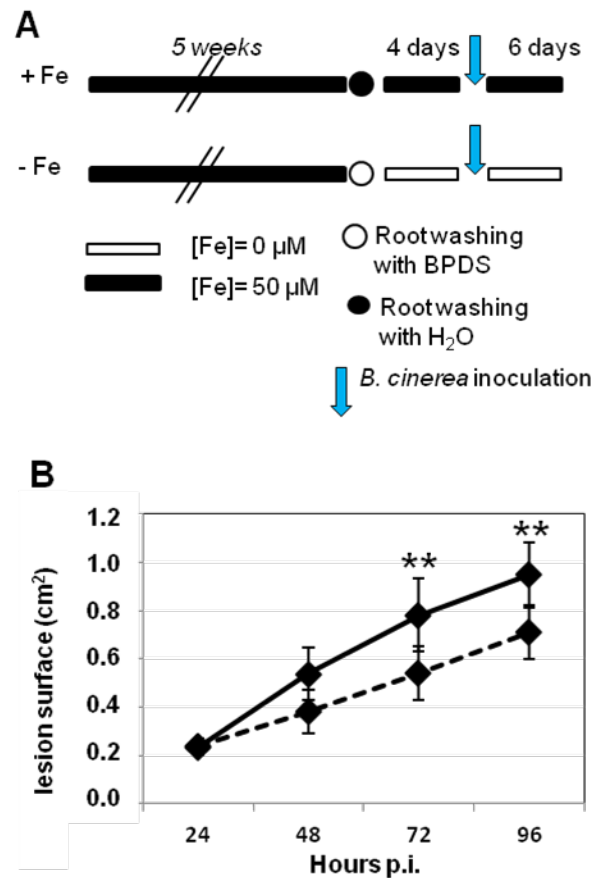


Fig. 7: Effect of Iron deficiency on *Botrytis cinerea* symptoms development in *Arabidopsis* leaves. (A): Experiment design for +Fe and –Fe plants. Detached leaves were inoculated with *B. cinerea* mycelium plugs. (B): Surfaces of maceration lesions were monitored at indicated times after inoculation on +Fe plants (filled lines) or iron starved plants (dotted lines) Bars=SE, n=20-24 leaves. Asterisks indicate statistically significant differences between iron starved and non starved plants $p<0.001$ (Mann and Whitney). Data are representative of three independent experiments.

The only defense that appeared to be enhanced in iron starved plants is the expression of the SA pathway marker gene *PR1*. Would this pathway be involved in enhanced resistance to *D. dadantii* in iron starved plants? Previous data, based on the study of the Arabidopsis SA deficient mutant *sid2* indicating that defenses mediated by SA are not effective against *D. dadantii* infection (Fagard et al., 2007), do not support this hypothesis. However, the mode of action of SA which is supposed to interfere with the intracellular redox status has still not been clarified. We can assume that some SA mediated effects depend on the plant physiological status. Iron starved plants are metabolically different from non starved plants (Yang et al., 2010) and SA is a powerful iron scavenging molecule (Nurchi et al., 2009). This compound might be used by the plant to mobilize iron under deficiency and to withhold this metal from pathogens.

Our data are reminiscent of the observations reported by Lina et al. (2011). These authors demonstrate that plant nutrition conditions have an important impact on the establishment of defenses. They showed that in *A. thaliana*, modifying the level of saccharose or vitamins in the growth medium affects the intensity of callose deposition and of hydrogen peroxide accumulation in response to Flg22 and chitosan. It is therefore of primary importance to consider the effects of the nutrition on plant defenses especially in the context of agronomical important species.

We tested the possible effect of iron on the infection process of a fungal pathogen, *B. cinerea*. Interestingly, we found that iron starved Arabidopsis plants display enhanced resistance against this pathogen. Whether this effect is related to changes in expression of the fungal virulence and/or of the plant defense system require further investigations. We found that iron starvation reduces *B. cinerea* growth and stimulates accumulation of siderophores suggesting that iron starved plants could affect the fungus fitness. Konetschny-Rapp et al (1988) chemically identified the siderophore produced by a rose derived strain of *B. cinerea* as being the ferrirhodin. The findings obtained in this study with two soft rot causing and large host range pathogens suggest that the corresponding lifestyle is affected by the plant iron nutrition. Further investigation of *B. cinerea* iron uptake mechanisms in disease progress could provide valuable data to improve crop protection.

We should mention that studies conducted on other pathosystems showed different results from ours. For instance, Anderson and Guerra (1985) observed an increase in severity of *Fusarium solani* caused disease on iron restricted bean seedlings. Similarly, infection levels by *Verticillium dahliae* of tomato resistant genotypes increased when the plants were grown under iron deficient conditions (Macur et al., 1991). In these reports, the authors studied plant pathogens that invade the root vascular system. Thus, the influence of plant iron nutrition on host pathogen relationships differs according to the pathogen considered. This is reminiscent of what has been reported for

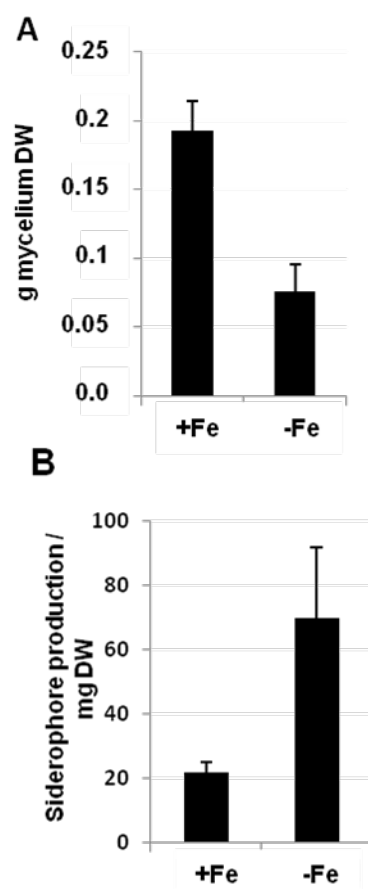


Fig. 8 : Impact of iron deficiency on *B. cinerea* growth and siderophore production. *Botrytis cinerea* liquid cultures were grown for 5 days in Czapek medium with (+Fe) or without iron (-Fe). (A): *B. cinerea* mycelium dry weight. (B): Siderophore production expressed as relative absorbance at 630 nm monitored by CAS assay / mg of mycelium dry weight.

nitrogen fertilization which can either promote or limit infections depending on the pathogen, the host plant and the chemical form of nitrogen supplied (Huber & Watson, 1974, Snoeijers *et al.*, 2000). In the same way, crop iron fertilization could influence the intensity of disease caused by pathogens. Therefore, no generalization should be done concerning the role of plant mineral nutrition on microbial disease development. Such investigations are of primary importance in an agronomical context where a reduction of mineral fertilization and pesticide crop treatments is becoming compulsory. Together, these reports provide valuable data to develop crop genotypes with efficient mineral use and uptake properties without increase in susceptibility to plant pathogens.

Supplementary Table 1

Name of gene	Forward primer's sequence 5'-3'	Reverse primers's sequence 5'-3'
<i>pelA</i>	CCGCAACGTCTACATCCAAA	CGTCGCCTTTTTCGTAATGC
<i>pelB</i>	TCAGGCGTTAATCGAAAGCA	GGACGTCACCGGGTTCAC
<i>pelC</i>	GCTGCTGGCTTTTAGTCAATCC	CGGAAGTGGTGGCGTAACC
<i>pelD</i>	CGCGTACGCTTTGGTAGCA	TTTCACGTCGCCCAGATACA
<i>rpoB</i>	AATCGAAGGTTCCGGGATTC	GCCGTTACGGATATCGATGAG
<i>PR1</i>	TCTTCCCTCGAAAGCTCAAGA	GTCCCTGGTTGTGAACCCTTA
<i>AtFer1</i>	CAGACTACATCACCCAGCTAAGGA	TCTGGTCGAAATGCCAACTC
<i>CHIB</i>	ATCGTATAGGGTTTTATCAGAGGTATTGT	AGGAGGCCGTTAACGAAGGA
<i>EF1α</i>	CGTCACCCTAGCCGCTTTAC	CCCATGGTTAGAGACTGTCAAACA

Experimental procedures

Plant material and growth conditions

A. thaliana seeds from the Col-0 ecotype were obtained from the INRA Versailles collection. For hydroponic cultures, seeds were first stratified for two days at 4°C in a nutrient solution (described below) containing 0.1% agar. Seeds were then individually sown in Eppendorf tubes cut at the bottom and filled with 0.75% agar. They were placed in PVC holders floating on the nutrient solution. Plants were allowed to grow for 5-6 weeks. The nutrient solution contains 0.25 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 1mM KH₂PO₄, 0.5 mM KNO₃, 1mM MgSO₄·7H₂O, 50 µM H₃BO₃, 19 µM MnCl₂·4H₂O, 10 µM ZnCl₂, 1 µM CuSO₄·5H₂O, 0.02 µM Na₂MoO₄·2H₂O and 50 µM FeNa-EDTA. Plants were subjected to an 8 h light/16 h dark cycle, at 19°C, with 70% relative humidity. For –Fe plants, seedlings were first grown under the above described conditions for 5 weeks then transferred to iron deficient medium after washing the roots for 5 min with medium containing the reductant sodium dithionite (5.7 mM) and the chelator bathophenanthroline disulfonic acid (BPDS 0.3 mM) both from Sigma, St. Louis, USA.

Bacterial and fungal strains and culture conditions

The wild-type strain, *Dickeya dadantii* (previously named *Erwinia chrysanthemi* 3937 our collection), was isolated from *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (African violet). Growth conditions were as described in Dellagi et al. (2005). The *B. cinerea* wild type strains BO5.10 was maintained on malt agar medium for virulence tests and cultivated on potato dextrose agar for conidia production. For the determination of fungal dry weight (DW) and siderophore production the fungus was cultivated in liquid Czapek medium as described by Reignault et al. (2000) with 3% glucose as carbon source. Liquid medium was supplemented with or without 36 µM FeSO₄·7 H₂O. Cultures of 50 mL were inoculated with a final concentration of 3 x 10⁵ conidia mL⁻¹ and grown for 5 days.

Determination of fungal biomass and siderophores in fungal culture filtrates

Liquid cultures of *B. cinerea* were filtrated on tissue with 100 µm pore size and the mycelium dry weight determined by weighing the fungal biomass after 2 days drying at 80°C. Siderophores in the culture filtrates were determined spectrophotometrically using a CAS-iron III assay according to Schwyn and Neilands (1987). CAS-iron absorbs at 630 nm and when a strong chelator removes the iron from the dye, its color turns from blue to orange. Results correspond to relative absorbance per mg fungal dry weight. Relative absorbance was calculated as follow : (A₆₃₀ reference - A₆₃₀ culture filtrate / A₆₃₀ reference) x 100% with uninoculated culture medium as reference.

Plant inoculations and determination of bacterial number

For the scoring of symptoms, and determination of bacterial populations *in planta*, a small hole was made with a needle within the leaf and 5 µL of a bacterial suspension at a density of 10^7 C.F.U./mL made up in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) were spotted on the hole. One leaf per plant was inoculated and 24-30 plants were used in each experiment. Symptom severity was scaled (Fig. 2B) as follows: 0: no symptom; 1: maceration at the site of inoculation; 2: maceration has spread to about half of the leaf; 3: maceration has spread to the whole leaf; 4: maceration has started to spread to the rest of the plant. Fisher's exact test was used to compare symptom distributions (Simple Interactive Statistical Binomial website). For determination of bacterial number, leaves were harvested in 0.9 % NaCl and ground using a pestle and sterile sand. The resulting suspensions were used for serial dilutions followed by plating on M9 minimal medium (Sambrook et al.1989).

For RNA extractions, callose or H₂O₂ staining we used a syringe without a needle to infiltrate the entire leaf or a portion of the leaf with the bacterial suspensions at 10^7 CFU/mL in 10 mM MgSO₄ (half a leaf was infiltrated for callose and H₂O₂ staining). For RNAs analysis, callose and H₂O₂ staining; 3 leaves were inoculated on each plant, 6 plants were used in each experiment.

Detached *A. thaliana* leaves were inoculated with *B. cinerea* mycelium plugs and lesion spreading scored as described in Arbelet et al. (2010).

RNA extraction, quantitative RT-PCR

Leaves were harvested at indicated time points after treatment then frozen in liquid nitrogen. Total RNAs were purified with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was determined using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, U.S.A.). RNA samples were treated with Turbo DNaseI (Ambion) RNase-free to remove any DNA contamination. A total of 1 µg of DNase treated RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and 50 ng of random hexamers following the supplier's instructions. One µl of the 1:10 diluted cDNA was subjected to real time qPCR using SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) and gene specific primers designed to amplify 100-150 bp fragments from each gene of interest and the reference genes *EF1α* and *rpoB* used for *A. thaliana* and *D. dadantii* respectively. Primers sequences are indicated in Table S1. Real-time quantitative PCR analysis was performed using a 7300 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). For the fold expression of *D. dadantii* pectinases genes *in planta*, data were expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. For example for *pelB*, the fold expression at a given time point is : $2^{-[[Ct_{pelB} (+Fe) - Ct_{rpoB} (+Fe)] - [Ct_{pelB} (-Fe) - Ct_{rpoB} (-Fe)]]}$.

Callose deposition analysis by aniline blue staining and quantification

Leaves were stained with aniline blue then examined by epifluorescence microscopy, as previously described (Fagard et al. 2007). For each leaf, a representative image was obtained, with an exposure time of 835 ms. Image J software was used for image analysis (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.). The color image was transformed into 8-bit grayscale pictures then callose spots were counted in a field of 0.6 mm². Experiments were performed 3 times with similar results.

Hydrogen peroxide staining and quantification

H₂O₂ detection method was adapted from Zhang and associates (2004) . At different time points following leaf infiltration with the bacterial strain or the control 10 mM MgSO₄; leaves were excised then stained by vacuum infiltration in a 300µM 2,7-dichlorofluorescein diacetate solution, in the dark at room temperature. Observations were done 15 minutes later. Whole-leaf images were taken using an Olympus SZX12 binocular magnifier and pictures were captured after 30 seconds of excitation at 470 nm. RGB split was performed on whole leaf pictures using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A), green was converted into grey and mean grey values were calculated. Experiments were performed 3 times with similar results.

Quantification of plant iron content

Leaves were harvested from healthy -Fe and +Fe plants. Iron content was determined using the protocol described in Lanquar et al. (2010).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). D.E. is a researcher at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). N.K.P. was granted from the the government of Vietnam. A.A. and D.S. were funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank O. Patrit for technical help, and S. Thomine and N. Chen for iron quantifications.

References

- Anderson, A.J., and Guerra, D. (1985) Responses of Bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology*, 75, 992-995.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Reviews*, 27, 215-237.
- Arbelet, D., Malfatti, P., Simond-Cote, E., Fontaine, T., Desquilbet, L., Expert, D., *et al.* (2010) Disruption of the Bcchs3a Chitin Synthase Gene in Botrytis cinerea Is Responsible for Altered Adhesion and Overstimulation of Host Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 1324-1334.
- Briat, J. F., Arnaud, N., Cellier, F., Curie, C., Gaymard, F., Ravel, K., *et al.* (2007) Iron uptake and storage in plants. *American Journal of Hematology*, 82, 506-507.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., *et al.* (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to Erwinia chrysanthemi infection. *Plant Journal*, 43, 262-272.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M. L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 5624-5628.
- Enard, C., Diolez, A. and Expert, D. (1988) SYSTEMIC VIRULENCE OF ERWINIA-CHRYSANTHEMI 3937 REQUIRES A FUNCTIONAL IRON ASSIMILATION SYSTEM. *Journal of Bacteriology*, 170, 2419-2426.
- Expert, D. (1999) Withholding and exchanging iron: Interactions between Erwinia spp. and their plant hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 307-334.
- Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Perino, C., Rigault, M., Boucher, V., *et al.* (2007) Arabidopsis thaliana expresses multiple lines of defense to counterattack Erwinia chrysanthemi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 794-805.
- Franza, T., Mahe, B. and Expert, D. (2005) Erwinia chrysanthemi requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55, 261-275.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G., *et al.* (2008) The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in Arabidopsis Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against Botrytis cinerea. *Plant Physiology*, 148, 1695-1706.

- Gaymard, F., Boucherez, J. and Briat, J. F. (1996) Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochemical Journal*, 318, 67-73.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Haas, H., Eisendle, M. and Turgeon, B. G. (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 149-187.
- Huber, D. M. and Watson, R. D. (1974) NITROGEN FORM AND PLANT DISEASE. *Annual Review of Phytopathology*, 12, 139-165.
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, J. M., Ecker, J. R., *et al.* (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314, 1295-1298.
- Kobayashi, T., Nakanishi, H. and Nishizawa, N. K. (2010) Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 86, 900-913.
- Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Huschka, H-G. and Winkelmann, G. (1988) Isolation and identification of the principal siderophore of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Biometals*, 1, 90-98.
- Kraepiel, Y., Pedron, J., Patrit, O., Simond-Cote, E., Hermand, V. and Van Gijsegem, F. (2011) Analysis of the Plant *bos1* Mutant Highlights Necrosis as an Efficient Defence Mechanism during *D. dadantii*/*Arabidopsis thaliana* Interaction. *Plos One*, 6.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., *et al.* (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo Journal*, 24, 4041-4051.
- Lanquar, V., Ramos, M. S., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kraemer, U., *et al.* (2010) Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiology*, 152, 1986-1999.
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Cote, E., Nasser, W., *et al.* (2008) The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environmental Microbiology*, 10, 545-559.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. and Briat, J. F. (2009) Role of Iron in Plant-Microbe Interactions. *Plant Innate Immunity*, 51, 491-549.

- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Ton, J. (2011) Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 183-193.
- Macur, R. E., Mathre, D. E. and Olsen, R. A. (1991) INTERACTIONS BETWEEN IRON NUTRITION AND VERTICILLIUM WILT RESISTANCE IN TOMATO. *Plant and Soil*, 134, 281-286.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. *Mineral nutrition of higher plants*.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., *et al.* (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16, 300-309.
- Morrissey, J. and Guerinot, M. L. (2009) Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. *Chemical Reviews*, 109, 4553-4567.
- Munzinger, M., Budzikiewicz, H., Expert, D., Enard, C. and Meyer, J. M. (2000) Bacterial constituents. Part LXXXIX - Achromobactin, a new citrate siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 55, 328-332.
- Murdoch, L., Corbel, J. C., Reis, D., Bertheau, Y. and Vian, B. (1999) Differential cell wall degradation by *Erwinia chrysanthemi* in petiole of *Saintpaulia ionantha*. *Protoplasma*, 210, 59-74.
- Nurchi, V. M., Pivetta, T., Lachowicz, J. I. and Crisponi, G. (2009) Effect of substituents on complex stability aimed at designing new iron(III) and aluminum(III) chelators. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 227-236.
- Perombelon, M. C. M. (2002) Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51, 1-12.
- Persmark, M., Expert, D. and Neilands, J. B. (1989) ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND SYNTHESIS OF CHRYSOBACTIN, A COMPOUND WITH SIDEROPHORE ACTIVITY FROM *ERWINIA-CHRYSANTHEMI*. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 3187-3193.
- Petit, J. M., Briat, J. F. and Lobreaux, S. (2001) Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochemical Journal*, 359, 575-582.
- Pierre, J. L. and Fontecave, M. (1999) Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals*, 12, 195-199.
- Ravet, K., Touraine, B., Kim, S. A., Cellier, F., Thomine, S., Guerinot, M. L., *et al.* (2009) Post-Translational Regulation of AtFER2 Ferritin in Response to Intracellular Iron Trafficking during Fruit Development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2, 1095-1106.
- Reignault, P., Kunz, C., Delage, N., Moreau, E., Vedel, R., Hamada, W., *et al.* (2000) Host- and symptom-specific pectinase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 104, 421-428.

Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L. and Guerinot, M. L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397, 694-697.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., *et al.* (2009) NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant Journal*, 58, 195-207.

Snouijers, S. S., Perez-Garcia, A., Joosten, M. and De Wit, P. (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 493-506.

Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C. and Birch, P. R. J. (2003) Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4, 17-30.

Winkelmann, G. (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals*, 20, 379-392.

Yang, T. J. W., Lin, W.-D. and Schmidt, W. (2010) Transcriptional Profiling of the *Arabidopsis* Iron Deficiency Response Reveals Conserved Transition Metal Homeostasis Networks. *Plant Physiology*, 152, 2130-2141.

Zhang, C., Gutsche, A. T. and Shapiro, A. D. (2004) Feedback control of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 357-365.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VI : Discussion générale et perspectives

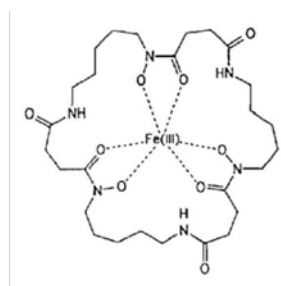
Au cours de ma thèse, j'ai confirmé le rôle critique du fer lors de l'interaction entre la plante *A. thaliana* et la bactérie phytopathogène *D. dadantii*. J'ai contribué à démontrer que la chélation du fer par les sidérophores microbiens provoque l'induction des défenses d'*A. thaliana*, notamment l'activation des défenses dépendantes de la voie de l'acide salicylique. J'ai mis en évidence que l'expression du gène *IRT1*, codant un transporteur de fer racinaire, est nécessaire pour la mise en place des défenses de la plante lors d'un traitement sidérophore et de l'infection par *D. dadantii*. J'ai également caractérisé le mutant *mpk11* qui est affecté dans l'adaptation à la carence en fer et à la réponse aux sidérophores. D'autre part, j'ai utilisé une méthode de localisation du fer qui apporte de nouvelles informations quant à la stratégie d'utilisation du fer par la plante et du processus de pathogénie par *D. dadantii* au site d'infection.

Les résultats obtenus à travers ce travail de thèse soulèvent de nouvelles questions que je propose de traiter dans cette discussion.

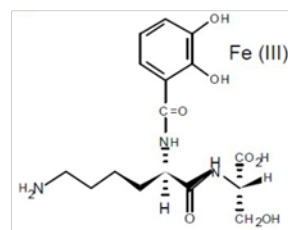
1. Comment les sidérophores sont-ils perçus par les plantes?

1.1. Existe-t-il un récepteur des sidérophores chez la cellule végétale?

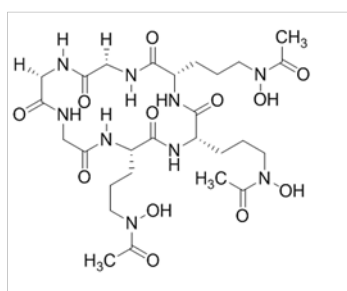
Les résultats de l'analyse transcriptomique montrent que la réponse de la plante aux sidérophores est très fortement ressemblante à une réponse à un stress biotique. En effet, les gènes les plus exprimés en réponse à la DFO appartiennent à la catégorie fonctionnelle des gènes de défense (Figure I.3). Ce profil de réponses est similaire à un profil d'expression de gènes en réponse à un traitement MAMP de la plante. Nous nous sommes alors interrogés sur l'existence d'un récepteur de sidérophore chez *A. thaliana*. Dans un premier temps, nous avons utilisé des chélateurs de fer de structures moléculaires différentes qui assurent la fixation de Fe^{3+} par différents groupements : la DFO et la CB, qui sont des sidérophores de types catécholate et hydroxamate respectivement (Figure VI.1), et l'EDDHA, un composé de synthèse. Ces trois molécules ne partageant pas de structure conservée, l'hypothèse d'un récepteur végétal commun est écartée. Lorsqu'un récepteur est présent, une très faible quantité de ligand est nécessaire à sa reconnaissance, comme le peptide flg22 qui est reconnu dès 2pg par FLS2 ou Fe-entérobactine qui est reconnue dès 20nM par NGAL (Felix et al., 1999; Goetz et al., 2002). Pour déterminer la plus faible concentration de sidérophore infiltrée responsable de la réponse chez *A. thaliana*, nous avons réalisé une expérience de dose-



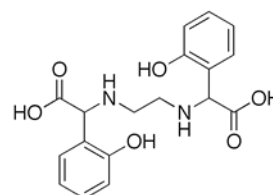
Ferrioxamine-B



Chrysobactine



Ferrichrome



EDDHA

Figure VI.1: Les structures des chélateurs de fer utilisés dans cette étude.

réponse (Figure II. S8). Cette expérience montre qu'en dessous de 100µM de DFO, l'expression des gènes marqueurs de la réponse immunitaire et de la réponse à la carence en fer, *WRKY46* et *IRT1*, n'est pas activée. Cette expérience montre également une intensité décroissante des dépôts de callose entre DFO à 1mM et DFO à 10µM. Ces deux arguments ne sont pas en faveur de l'hypothèse de l'existence d'un récepteur de sidérophore.

1.2. Quel est le mécanisme de perception des sidérophores chez la cellule végétale?

Les résultats obtenus précédemment dans l'équipe et au cours de cette étude démontrent que les réponses de défense et de remodelage du métabolisme du fer dépendent de la chélation du fer. Comme cela vient d'être rappelé, nous avons employé des chélateurs de fer d'origines biologique ou synthétique qui provoquent une élévation du système immunitaire et une perturbation de la gestion du métabolisme du fer chez *A. thaliana*. Dès lors que les sidérophores DFO et CB sont infiltrés dans les feuilles sous la forme ferri-sidérophore Fe-DFO et Fe-CB, la plante n'induit pas ces réponses (Figure II.S3) (Dellagi et al., 2009).

Dans les tissus foliaires, l'infiltration de sidérophore pourrait générer soudainement et localement des flux de fer depuis des protéines ou des compartiments de stockage vers l'apoplasme où est infiltré le sidérophore. La coloration du fer histologique des cellules de mésophylle nous indique que la répartition du fer dans la paroi et les chloroplastes semble affectée par l'infiltration de sidérophores (Figure II.7). La coloration est alors plus intense dans la paroi et le nombre de points de coloration diminue dans les chloroplastes après le traitement sidérophore. La perturbation des flux de fer ou des quantités relatives de fer entre les compartiments pourrait être perçue par la plante, par un senseur du fer par exemple. Une autre possibilité est que la circulation du fer dans la cellule produise du stress oxydatif par effet Fenton (Crichton, 2002). Les variations de la balance redox intracellulaire seraient alors à l'origine des réponses déclenchées par l'infiltration de sidérophores.

Une autre hypothèse sur le mécanisme de signalisation déclenché par les sidérophores peut être émise. Lors de l'infiltration de sidérophore, le fer disponible dans le tissu est chélaté, ce qui pourrait provoquer une diminution de la quantité de fer disponible pour la cellule comme le suggère la répression de l'expression de *AtFER1* à 7h p.i.. Chez le riz, la perception de la quantité de fer dans la cellule par IDEF1 dépendrait de la quantité relative des autres métaux dans la cellule (Kobayashi et al., 2012). Lors d'une carence en fer, la quantité de fer disponible pour la cellule diminue, contrairement aux autres métaux qui de ce fait sont, relativement au fer, plus abondants. Si un tel système de perception du fer existe chez *A. thaliana*, les faibles quantités de Mn et Zn ne permettraient pas la détection de la chélation du fer par le sidérophore dans les feuilles de *irt1*, et pourrait expliquer l'absence de réponses immunitaires chez *irt1*. Chez *irt1*, la quantité de fer

présente dans les feuilles est similaire à celle présente chez la plante sauvage, alors que les niveaux de Mn et de Zn sont inférieurs (Figure II.57). En effet, en comparant des plantes cultivées dans des conditions optimales de nutrition en fer ou en conditions de carence, il serait intéressant de déterminer si les quantités relatives d'autres métaux comme Mn, Zn et Cu sont importantes pour l'éllicitation des défenses de la plante par les sidérophores. Par ailleurs, le transport actif du fer par IRT1 pourrait contribuer à l'activation des défenses par le sidérophore.

Dans la cellule, le fer n'est pas sous une forme libre mais associé à des protéines comme les SOD ou alors en interaction avec des ligands tels que le citrate ou la NA (Kobayashi and Nishizawa, 2012). Lors de traitements sidérophores, ces protéines et ligands pourraient être privés de leur atome de fer, ce qui provoquerait une modification de leurs fonctions ou la dégradation des protéines. Par exemple chez les animaux, lorsque la quantité de fer diminue dans la cellule, la protéine IRP1 perd son atome de fer et n'assure plus sa fonction aconitase, ce qui modifie l'action de la protéine qui réprime alors la traduction d'ARNm de gènes de réponse au fer (Encart I.1) (Anderson et al., 2012). D'autre part, en absence de liaison au fer, les ligands libres dans la cellule pourraient assurer la fixation d'autres métaux, comme une fixation du cuivre par la NA (Curie et al., 2008). Ces perturbations soudaines de modification d'activité protéique ou d'ions associés aux ligands de Fe^{3+} pourraient être détectées par des protéines spécifiques et initier la signalisation déclenchée par les sidérophores.

Si nous écartons l'hypothèse d'un récepteur des sidérophores, il est donc possible qu'une ou plusieurs protéines soient responsables de la reconnaissance de ces modifications. La modification de certaines protéines peut être surveillée comme c'est le cas pour la reconnaissance de certains effecteurs bactériens de types III. Par exemple, le récepteur NB-LRR RPM1 d'*A. thaliana* ne reconnaît pas directement l'effecteur AvrRpm1 de *P. syringae* mais la modification de la cible de cet effecteur RIN4 (Liu et al., 2011). En effet, dans la cellule végétale AvrRpm1 provoque la phosphorylation de la protéine RIN4, et c'est la reconnaissance de la forme phosphorylée de RIN4 par RPM1 qui déclenche l'ETI. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une protéine de type NB-LRR pourrait détecter une modification d'un ligand du fer et activerait des réponses immunitaires.

1.3. Comment le signal déclenché par les sidérophores est-il transmis aux racines?

Quel que soit le mécanisme employé par la cellule végétale pour intégrer le stress créé par la présence de sidérophore, ce signal est transmis jusque dans les racines et active l'acquisition du fer racinaire. Au cours de ce travail, il a été montré que des événements de déphosphorylation participent à l'activation du métabolisme du fer dans les feuilles et les racines (Figure II.8). Bien que dans la mise en place des réponses immunitaires nous n'avons pas mis en évidence l'intervention

d'événement de déphosphorylation, il est possible que la perte de groupement phosphates participent à l'activation des défenses. Très récemment, une étude du phosphoprotéome d'*A. thaliana* en réponse à la flagelline a révélé qu'en plus d'événements de phosphorylation, des événements de déphosphorylation sont requis pour la transduction de la perception du MAMP (Rayapuram et al., 2014). Ces résultats suggèrent l'action de phosphatases dans la voie de signalisation MAMP, et donc dans la mise en place des réponses de défense. La perte de groupements phosphates pourrait être un des mécanismes d'activation directe ou indirecte permettant le relargage d'une molécule signal, tel qu'un facteur de transcription, par déstabilisation d'un complexe protéique par exemple.

D'autre part, l'étude des phénotypes du mutant *mpk11* nous donne des arguments en faveur d'un contrôle de *MPK11* sur la régulation de *FRO2* et d'*IRT1*. D'après les informations disponibles dans les bases de données publiques, le gène *MPK11* est strictement exprimé dans les feuilles. Bien que préliminaires, ces données nous laissent supposer que *MPK11* pourrait être un acteur de la transduction du signal des feuilles vers les racines.

Comme évoqué précédemment, la chélation du fer pourrait générer précocement, entre le traitement sidérophore et l'activation de l'expression de *IRT1* et *FRO2*, une modification de la balance redox du contenu du phloème. La circulation systémique de la sève du phloème pourrait alors assurer la transmission du signal de perturbation des stocks de fer de la partie aérienne jusque dans les racines. Chez *A. thaliana*, un marquage radioactif de l'acide ascorbique produit dans les feuilles a montré son transport vers les organes puits par l'intermédiaire du phloème en condition d'un stress d'exposition à une forte lumière (Franceschi and Tarlyn, 2002). Parmi ces organes puits identifiés se trouve la pointe racinaire. Un déséquilibre de la balance redox pourrait affecter la production d'acide ascorbique, faire varier les quantités transportées dans les racines par le phloème et ainsi modifier la régulation de *IRT1* et *FRO2*.

2. Comment le métabolisme du fer influence-t-il les réponses immunitaires d'*A. thaliana* ?

Afin de déterminer si l'activation de la machinerie d'acquisition du fer racinaire participe à la mise en place des réponses immunitaires, nous nous sommes intéressés à la contribution de l'acquisition du fer *via* le transporteur racinaire *IRT1* et à l'effet de la carence en fer sur l'infection par *D. dadantii* et *B. cinerea* (Figure VI.2).

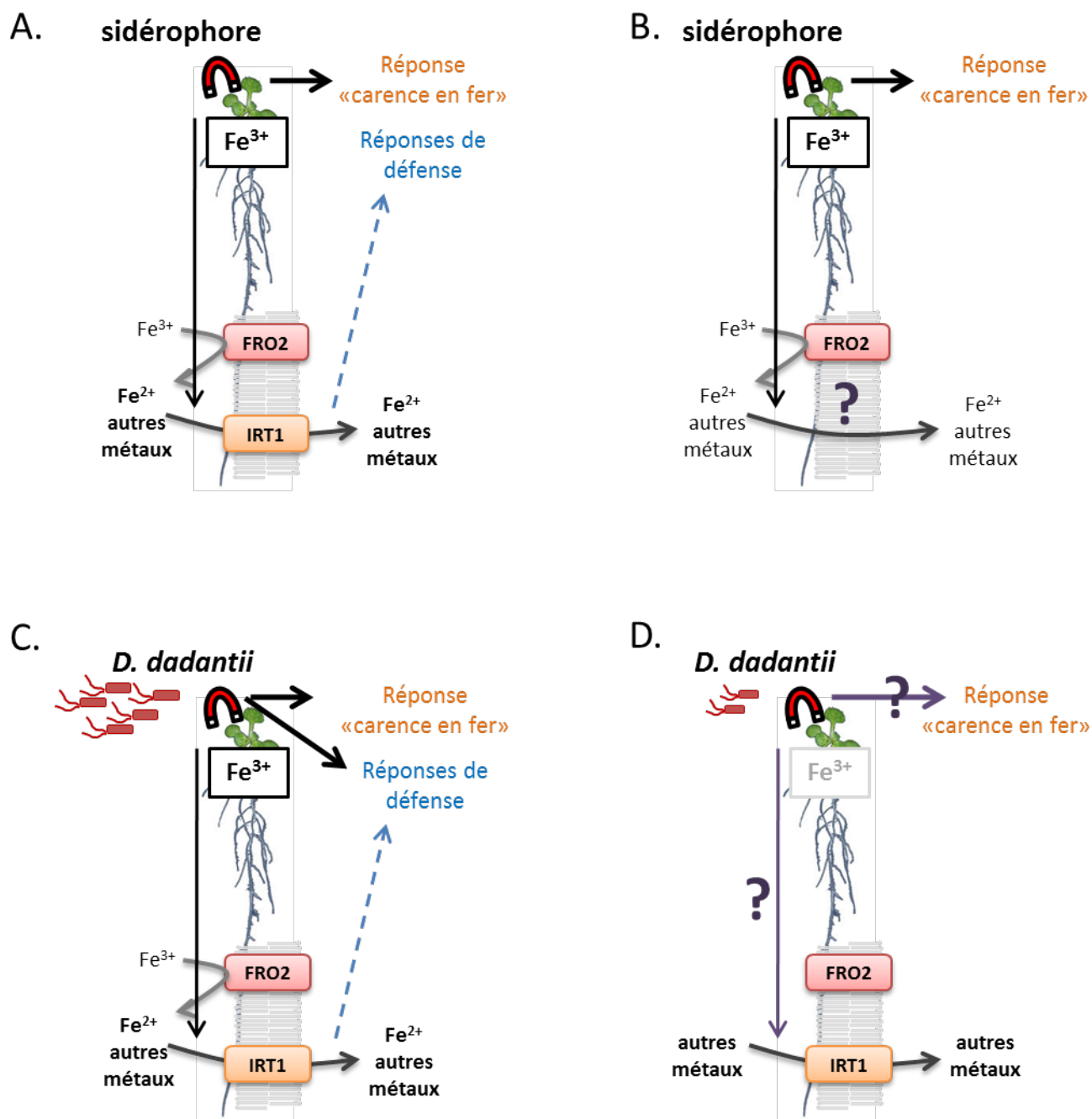


Figure VI.2: Contribution de l'acquisition du fer racinaire et de IRT1 dans la réponse immunitaire d'*A. thaliana*.

- A. Chez la plante sauvage lors de l'infiltration de sidérophore.
- B. Chez le mutant *irt1* lors de l'infiltration de sidérophore.
- C. Chez la plante sauvage en condition optimale de nutrition en fer.
- D. Chez la plante sauvage en condition de carence en fer.

Nous avons voulu connaître l'effet du statut en fer de la plante sur le développement de la maladie de la pourriture molle causée par *D. dadantii*. Pour cela, nous avons évalué des facteurs d'agressivité de la bactérie ainsi que les réponses de défense d'*A. thaliana* dans des conditions optimale et limitante de nutrition en fer de la plante (Kieu et al., 2012). Ces expériences nous ont permis de constater qu'en condition de carence en fer, la sévérité de la maladie est réduite (Figure IV.2). Cette tolérance n'est pas due à une augmentation des défenses de la plante. En effet, nous avons pu constater qu'en condition de carence en fer, nous n'avons pas observé d'élévation du niveau de défense de la plante. En revanche, cette tolérance est probablement due à une perte d'agressivité de la bactérie. Effectivement, en condition de carence en fer de la plante, très peu de facteurs d'agressivité sont produits par *D. dadantii* (Figure V.4). Conjointement, ces résultats indiquent que le statut en fer de la plante influence l'éllicitation de ses réponses immunitaires ainsi que l'agressivité de la bactérie phytopathogène nécrotrophe *D. dadantii*.

Concernant l'activation des défenses d'*A. thaliana* au cours de l'infection par *D. dadantii*, nous avons mis en évidence le fait que la présence de fer dans la plante est requise pour l'induction d'accumulation de callose et de H₂O₂. De plus, au laboratoire, il a été montré qu'en condition de carence ferrique, il n'y a pas d'activation des réponses de défenses par la CB (Dellagi et al., 2009). Ce qui suggère que la signalisation déclenchée par la CB requiert le fer pour activer l'immunité.

Par ailleurs, lors d'un traitement sidérophore, le mutant *irt1* n'est pas capable d'induire l'expression de *PR1* ni d'accumuler de la callose dans les feuilles, contrairement à ce qui est observé chez la plante sauvage (Figure II.9). D'autre part, l'infection de ce mutant par *D. dadantii* provoque des symptômes de macération plus intenses que lorsque le génotype sauvage est infecté. Dans ce contexte génétique, la perte d'induction des réponses immunitaires étudiées explique la plus grande sensibilité du mutant *irt1* vis à vis de l'attaque par le microorganisme pathogène. Ces résultats indiquent que le gène *IRT1* doit être exprimé pour qu'*A. thaliana* puisse déployer la totalité de son arsenal de défense lors de l'infection par *D. dadantii*.

En observant la répartition cellulaire du fer au cours de l'infection, nous avons mis en évidence une nette différence entre les tissus macérés et les tissus sains. En effet, les tissus macérés comportent très peu de fer alors que les bactéries qui s'y trouvent sont chargées en fer. Ces observations suggèrent que le fer contenu dans les parois cellulaires dégradées est acquis par les bactéries.

Ces différents résultats nous indiquent que le fer est élément important, dont la présence et la disponibilité conditionnent l'issue de l'infection. A travers la littérature, d'autres travaux montrent l'importance du statut en fer de l'hôte végétal lors de l'infection (Liu et al., 2007; Ye et al., 2014). Par exemple, dans le cadre de l'interaction entre la plante *Zea mays* et le champignon hémibiotrophe *C.*

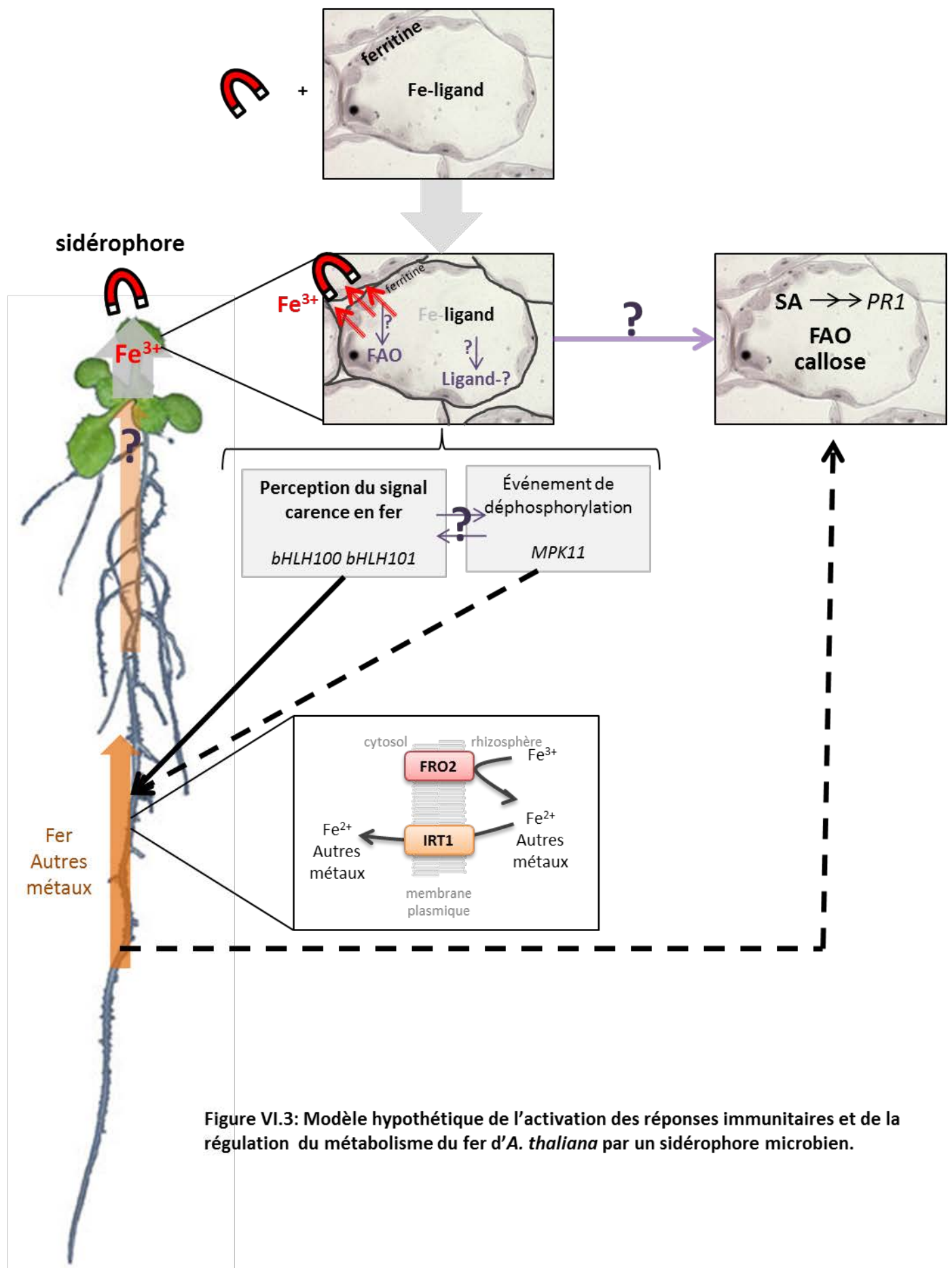


Figure VI.3: Modèle hypothétique de l'activation des réponses immunitaires et de la régulation du métabolisme du fer d'*A. thaliana* par un sidérophore microbien.

graminicola, le passage de la phase biotrophe à la phase nécrotrophe du champignon est favorisée lorsque le maïs est carencé en fer (Ye et al., 2014). Les auteurs ont mis en évidence que des plantes non carencées en fer produisent un stress oxydatif plus important lors de l'infection qui est corrélé à une meilleure résistance du maïs contre *C. graminicola*. Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle le fer présent dans la plante favorise la production de FAO ce qui augmente le niveau de défense de la plante et limite la maladie.

3. Quels sont les acteurs moléculaires communs au métabolisme du fer et à l'immunité?

3.1. La production de formes actives de l'oxygène

Comme cela vient d'être discuté, la production de FAO, qui contribue à la défense des plantes, dépend du statut en fer de la plante. Nous avons vu qu'une carence ferrique limite l'accumulation des FAO.

Au laboratoire, les travaux de thèse réalisés par D. Segond ont mis en évidence que le transporteur vacuolaire des métaux divalents NRAMP3 est nécessaire à la mise en place de certaines réponses de défense d'*A. thaliana* contre *D. dadantii*, notamment via la production de FAO (Segond et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs émettent l'hypothèse que la sortie du fer vacuolaire, assurée par NRAMP3, créerait des FAO par la réaction de Fenton et amplifierait le stress oxydatif lors de l'infection.

Lors d'un stress biotique, la production de FAO fait partie des réponses de défense basales, et sont majoritairement produites par les NADPH oxydase RBOHD et RBOHF (Torres and Dangl, 2005). La chélation du fer des cellules végétales par les microorganismes pathogènes en général, et particulièrement par les sidérophores, pourrait amplifier cette production de FAO. Ainsi les FAO pourraient être l'origine commune de la signalisation qui conduit à l'activation de réponses de défenses et activer un signal de remodelage du métabolisme du fer dans la plante.

3.2. L'accumulation d'acide salicylique

Outre son rôle d'hormone végétale impliquée dans la réponse immunitaire, l'acide salicylique est un chélateur de métaux, et notamment du fer (Nurchi et al., 2009). En réponse à un traitement sidérophore, la production de SA pourrait résulter d'une stratégie de rétention du fer de la cellule végétale.

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire montrent que le traitement CB provoque une accumulation de SA chez *A. thaliana*, et que ce traitement sur des plantes carencées en fer n'induit

pas d'accumulation de SA. Ces données indiquent que l'accumulation de SA en réponse au sidérophore est dépendante du statut en fer de la plante.

Chez *A. thaliana*, Wu et al. ont mis en évidence que la liaison du SA à son récepteur NPR1 est réalisée *in vivo* via la fixation d'un ion Cu^{2+} (Wu et al., 2012). En effet, NPR1 fixe un ion Cu^{2+} grâce aux cystéines 521 et 529, et la fixation du cuivre est requise pour la fixation du SA. La chélation de fer par les sidérophores pourrait favoriser la fixation de Cu^{2+} ou d'un autre métal par NPR1, et de ce fait favorise la fixation du SA et activer les réponses de défenses de la plante, notamment l'expression de *PR1*. Un élément en faveur de cette hypothèse est que NPR1 est requis pour l'activation de l'expression de *PR1* en réponse à la CB (Dellagi et al., 2009).

4. Conclusion générale

A l'image des travaux réalisés chez les mammifères, ce travail démontre un lien étroit entre la pathogénie et le métabolisme du fer chez les végétaux. Pour cela, nous avons développé une approche originale en traitant des feuilles d'*A. thaliana* avec des chélateurs de fer d'origine microbienne, les sidérophores. Cet outil nous permet à la fois d'étudier les mécanismes sous-jacents à l'établissement des réponses immunitaires et des réponses à la carence en fer, sans modifier la physiologie de la plante vis à vis de la nutrition en fer (Figure VI.3). Effectivement, nous avons montré qu'en perturbant localement le métabolisme du fer, il est possible d'élever le niveau de défense d'*A. thaliana* jusqu'à améliorer sa tolérance à la bactérie phytopathogène *Pst* DC3000.

5. Perspectives

Pour mieux comprendre la contribution des stocks de fer cellulaire dans la production de FAO en réponse aux sidérophores, il serait intéressant de déterminer l'intensité du stress oxydatif induit par le traitement chez le simple mutant *atfer1*, et le double mutant *ysl4 ysl6* affectés dans le stockage et le transport du fer chloroplastique, ainsi que dans le simple mutant *nramp3* affecté dans le transport du fer vacuolaire. L'évaluation de la contribution des stocks de fer chloroplastique et vacuolaire dans la génération ou l'amplification des FAO nous apporterait de nouvelles informations sur la circulation du fer intracellulaire en réponse au traitement sidérophore.

Dans les feuilles, la callose est accumulée le long des nervures de la feuille. Ce patron d'accumulation est atypique et intrigant, et il serait intéressant d'affiner l'observation des dépôts de callose en passant à l'échelle tissulaire et cellulaire afin de mieux comprendre quelles sont les cellules

concernées. Pour cela, l'observation de callose en microscopie confocale pourrait être réalisée sur des lignées d'*A. thaliana* exprimant des gènes marqueurs des différents types cellulaires de la feuille couplés à des protéines fluorescentes de type GFP.

La possibilité que la chélation du fer induite par les sidérophores soit perçue suite à la modification des concentrations relatives des différents métaux a été évoquée au cours de la discussion. Afin de tester cette hypothèse, les réponses immunitaires d'*A. thaliana* pourraient être analysées suite à l'application de stress de type carence ou excès de fer combinée avec d'autres métaux. De plus, chez le mutant *irt1*, dont les concentrations foliaires de Zn et de Mn sont affectées par l'absence d'IRT1, il serait intéressant d'évaluer l'accumulation de SA en réponse au traitement sidérophore. Les résultats issus de ces deux approches expérimentales nous permettraient d'obtenir rapidement des indications sur la pertinence de cette hypothèse.

L'identification du gène candidat *MPK11* comme acteur de la signalisation déclenchée par les sidérophores est une piste sérieuse qu'il faut continuer à suivre. Pour cela, il sera indispensable d'analyser les phénotypes de réponses aux sidérophores et à la disponibilité du fer de la lignée complémentée. Il sera également nécessaire de connaître les niveaux d'accumulation et d'activité kinase de MPK11 dans ces conditions. Ces expériences permettront d'écarter ou d'assigner définitivement le rôle de MPK11 dans la signalisation conduisant à l'éllicitation des défenses et à l'adaptation de la plante lors d'un traitement sidérophore.

La coloration Perls-DAB-H₂O₂ nous a permis de mieux caractériser la distribution du fer à l'échelle cellulaire dans le tissu foliaire d'*A. thaliana* infecté par *D. dadantii*. Récemment, la sonde fluorescente RPE a été mise au point pour détecter le Fe³⁺ libre *in vivo* dans des cellules neuronales humaines (Wei et al., 2012). En présence de Fe³⁺ libre, la molécule RPE fixe un ion Fe³⁺ provoquant alors une émission de fluorescence. Cette fixation du fer par la molécule RPE est réversible, ce qui permet de suivre aussi bien l'augmentation ou la diminution de la quantité d'ions Fe³⁺ libres dans la cellule. Bien que cette technique n'ait pas été utilisée sur du matériel végétal, le développement de cette méthode pourrait être un outil puissant pour décrypter la dynamique des flux de fer au cours du processus infectieux, ainsi qu'en réponse à un traitement sidérophore.

Enfin, un criblage génétique sur une banque de mutants ou sur des accessions naturelles permettraient d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la perception des sidérophores.

6. Projet de revue: " Microbial siderophores modulate host immunity"

Dans cette revue, nous faisons un état des lieux des connaissances sur les mécanismes de signalisation déclenchés par les sidérophores, chez les animaux et chez les plantes, qui conduisent à l'éllicitation des réponses de défense.

Nous souhaitons soumettre prochainement ce projet de revue au journal « Frontiers in Plant Science ».

Title of the manuscript: Microbial siderophores modulate host immunity

Authors:

Aude Aznar^{1,2}, Alia Dellagi¹

Corresponding author: Alia Dellagi

Address: ¹Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr (RD 10), F-78026 Versailles Cedex, France. ² Univ Paris 06, Case 156,4 Pl Jussieu, F-75005 Paris, France

Phone: +33 1 30 83 32 40

E-mail: dellagi@agroparistech.fr

Abstract

Microbes use siderophores to obtain iron from the environment. In microbial pathogens, siderophores are involved in iron acquisition from the host and are necessary for full virulence. To protect themselves against iron theft, mammalian hosts developed the hypoferrremia strategy which includes siderophore-binding molecules called siderocalins. Beside microbial ferrisiderophore sequestration, siderocalins are involved in triggering immunity. In plants, siderophores can trigger immunity in several contexts. The most described situation involving siderophores is the induced systemic resistance triggered by plant growth promoting rhizobacteria. This immunity can be observed following root treatment with siderophore. Immunity can also be triggered by siderophores in leaves. Recent advances in the mechanisms involved in immunity activation have been obtained. This review describes the recent data concerning these mechanisms.

Maintaining cells in a healthy state requires iron because this element is involved in many crucial metabolic processes. Indeed, its ability to easily exchange an electron under a large range of redox potentials makes iron a cofactor of choice in many enzymes undergoing electron transfer reactions. For example, iron is required for electron transport in the respiratory chain, in cell protection against oxidative damages as a component of peroxidases, catalases or some superoxide dismutases (Crichton, 2002). Under iron deficiency, around 10^{-6} M Fe, bacterial cells display affected growth and morphology, and reduced RNA and DNA synthesis have been reported (Braun and Hantke, 2011). Up to now, lactobacilli species have been reported to be the only species living without iron needs (Bruyneel et al., 1989). In human, iron-deficiency induced anemia can have dramatic health consequences such as weakness and heart diseases (Gupta and Gupta, 2014). In plants, iron deficiency results in photosynthesis malfunction which provokes typical chlorosis and growth defect (Hindt and Guerinot, 2012).

To obtain iron from environment, the most wide spread strategy developed by microorganisms is based on siderophore secretion and uptake. Siderophores are small molecules (less than 1kDA) displaying high affinity for Fe(III) as indicated by the Greek origin of the name (pherein and sideros means “iron carrier”). The word siderophore covers a unique function which can be carried out by different types of molecules. Thereby, siderophores are often classified in three classes according to the chemical moieties that bind iron by donating the oxygen ligand for Fe(III) (Figure IV.I): 1) catecholates (which are also called “aryl caps” and include phenolates), 2) hydroxamates, 3) carboxylates (or hydroxycarboxylates). Some siderophores can contain at least two different iron binding moieties and are thus referred to as mixed-types siderophores. Siderophores can have different affinities for iron. Differential affinity for iron can be compared with a chemical parameter which is the pFe and which represents the negative logarithm of the concentration of the free metal ion in a solution containing 10 μ M total ligand and 1 μ M total metal at a given pH. Usually, the pFe is measured at a pH which is considered physiological in animal fluids i.e. 7.4. The higher the pFe, the stronger is the affinity for iron. Siderophores are produced by virtually all microorganisms either prokaryotic or eukaryotic with the exception of *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. Those that cannot produce siderophores are able to use siderophores produced by other microorganisms, so-called xenosiderophores; owing to specific cell surface receptors. One or more siderophore per microorganism is secreted depending of the microbe and the starvation severity. In fungi, extracellular and intracellular siderophores can exist. They can be involved in transport or storage of ferric iron (Winkelmann, 2007)

Iron homeostasis in gram-negative and low GC-content gram-positive bacteria is mainly controlled by the Fur negative transcriptional regulator (Ferric Uptake Regulation). When iron is not limiting Fe(II) binds a putative site of 5 amino acids in the C-terminal domain of the protein, leading to the homo-dimerization of Fur. In *E. coli*, there are 90 genes containing a specific inverted repeat sequence of 19 bp, called the Fur box, on which Fur binds the target gene to reduce or to turn off its expression (Escobar et al., 1999). This set of genes includes siderophore biosynthesis genes or genes encoding the molecular machinery of the ferrisiderophore uptake. In gram-positive bacteria, the negative regulator DtxR, for Diphtheria Toxin Regulator, fulfils this function similarly to Fur in *Streptomyces*, *Corynebacteria* and *Mycobacteria*. Alternative sigma factors, two-component sensory transduction system, AraC-type regulators and other transcriptional factors are involved in the regulation of iron metabolism genes in microbial cells (Miethke and Marahiel, 2007).

Depending on the chemical structure of the siderophore, two types of biosynthetic pathways have been described (Crosa and Walsh, 2002). The first type depends on non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and concerns essentially aryl capped siderophores. The second type of biosynthetic pathways is NRPS independant, it concerns hydroxamates and carboxylates and it is based on a large variety of enzymatic reactions.

The NRPS pathway can be summarized in three steps: the first step is an adenylation of the precursor amino acid, then a thiolation of the precursor amino acid and finally a condensation and a cyclization of the derived product added to the polypeptide chain in formation. Some hydroxamates and carboxylates can be partially synthesized via NRPSs which contribute in the building of a peptidic backbone to which the iron-coordinating functions are attached. This is the case for ferrichrome and ferricrocin produced by several fungi (Miethke and Marahiel, 2007).

In general, the building of hydroxamate moieties is conducted in two steps. The first consists of an N-hydroxylation of an amino acids or a polyamine using molecular oxygen. This step is catalyzed by flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent monooxygenases. The second step consists of a formylation, but more often an acylation of the hydroxylated amine, and is usually catalyzed by acyl coenzyme A transferases. The final construction of the siderophore relies on the assembly of the building blocks via amide bond formation or in some cases via ester linkages like in achromobactine (Challis, 2005).

So far, siderophore secretion systems have been described in only a few microorganisms. Siderophores are exported from the microbial cell by efflux pumps belonging to three major superfamilies. The major facilitator superfamily (MFS) family of proteins contain 12-14 transmembrane domains and contribute to efflux of a large range of compounds including drugs,

metabolites and siderophores across the plasma membrane. They act in conjunction with outer membrane proteins to excrete the transported compound outside the cell. The second type of transporter is the resistance, nodulation and cell division superfamily (RND) of proteins which also transport drugs, metals, metabolites across the plasma membrane but have a few transmembrane domains and a large extra-cytoplasmic loop. The last type of siderophore efflux systems is based on ABC-type transporter superfamily proteins. They mediate siderophore transport via ATP hydrolysis.

In gram-negative bacteria, the ferri-siderophore complex can be taken up via specific outer membrane transporters. This process requires a “TonB complex” composed of three proteins: TonB, ExbB, ExbD. This complex provides energy to the outer membrane transporter using the membrane proton motive force. Then the ferri-siderophore complex is carried by an ABC transporter from the periplasm to the cytoplasm. In gram-positive bacteria, we can find similar ABC transporter machinery to take up ferri-siderophore complexes (Miethke and Marahiel, 2007).

Inside the microbial cell, iron is released from the ferri-siderophore complexes and therefore made available for the metabolic needs or could be stored to avoid cellular damages. There are two major mechanisms of iron release. The bond between iron and siderophore can be broken by the action of reductases or by competitive chelation. Specialized enzymes can also be involved in iron release via hydrolysis leading to a destabilization of the Fe-siderophore complex. In this case, the iron release is a siderophore destructing process and is accompanied with an energetic cost (Miethke and Marahiel, 2007).

When the siderophore is free in the cell, it can be recycled and secreted again in the surrounding environment. Alternatively, siderophores can be used intracellularly to maintain the iron labile pool level and avoid oxidative damages. However, siderophore degradation can happen like in *D. dadantii* where chrysobactin degradation occurs after iron reduced releasing by the CbsH peptidase (Rauscher et al., 2002).

Role of siderophores in pathogenicity

During microbial infection, a competition for iron between the host and the microorganism may take place. Microbes have designed specialized systems to steal iron from the host by taking up heme or glycoproteins involved in iron transport in the organism like transferrin and lactoferrin. In addition, siderophores are able to directly compete for iron owing to their high affinity for this element (for review Caza and Kronstad, 2013). In this context several reports indicate that in mammalian hosts siderophore production by microbial pathogens is required for full virulence. For instance, in the

highly lethal fungus *Aspergillus fumigatus*, both intracellular and extracellular siderophores contribute to the virulence. Indeed, deletion of key genes involved in the production of siderophores results in reduced virulence on mice as well as reduced resistance to oxidative stress (Schrettl et al., 2007). *Pseudomonas aeruginosa* is a bacterium causing important lung disease infections in particular in cystic fibrosis affected patients, and produces several siderophores including pyoverdine and pyochelin. Bacterial mutants unable to produce pyoverdine or pyochelin are unable to infect mice (Cornelis and Dingemans, 2013).

Similarly, phytopathogenic bacteria and fungi can use siderophores to multiply in the host and to promote infection (Expert, 1999; Haas et al., 2008). Oide et al. (2006) demonstrated that in four ascomycetes species, *Cochliobolus miyabeanus*, *C. heterostrophus*, *Fusarium graminearum* and *Alternaria brassicicola*, siderophores are required for resistance to hydrogen peroxide and for full pathogenicity on their respective hosts, maize, rice, wheat, and *A. thaliana* (Oide et al., 2006). Likewise, the fire blight causing agent *Erwinia amylovora* takes advantage of its siderophore deferrioxamine (DFO) for the infection of apple seedlings and flowers, and for the resistance to hydrogen peroxide (Dellagi et al., 1998). The siderophore chrysobactin promotes systemic symptom progression of the pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* on *Sainpaulia ionantha* and *Arabidopsis thaliana*. The action of chrysobactin is supposed to be both nutritional and related to the manipulation of the plant defence system (Dellagi et al., 2005; Dellagi et al., 2009). Biosynthesis of the siderophore pyoverdine *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* was shown to be indispensable for virulence in its host tobacco (Taguchi et al., 2010). Since the role of siderophores in pathogen virulence have been extensively reviewed in animals and plants (Haas et al., 2008; Cornelis and Dingemans, 2013; Franza and Expert, 2013), we will focus on an aspect of siderophore which is less known in host-microbe interactions which is their role in modulating host immunity.

Siderophores and animal Immune responses.

Mammals have developed different strategies to limit iron availability to pathogens; it is called the “hypoferremia strategy”. One of the mechanisms involved in this hypoferremia is to limit ferrisiderophore uptake by bacteria via some members of the lipocalin protein family. Proteins from the lipocalin family are characterized by a the so called “lipocalin fold”, an eight stranded antiparallel beta-barrel that forms a binding pocket with the shape of a calyx. Siderocalins are binding proteins of the lipocalin family involved in the binding of siderophores. The term siderocalin encompasses two proteins: Lcn1, also called Tear Lipocalin (TL) or von Ebner's gland protein, and Scn also called NGAL

for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in human, or Lcn2 or 24p3 in mouse, or Q83 or Ex-FABP in avian species (for review see Sia et al., 2013).

NGAL was first described as a protein present in human neutrophil gelatinase. This is a 25kDa glycosylated protein constitutively expressed in myelocytes and stored in specific granules in neutrophils. NGAL forms homodimeric- or heterodimeric-complex with gelatinase. It is known that during inflammation, the expression of NGAL increases in serum and in epithelial cells. Experiments have shown that KO mice for Lcn2 are more susceptible to *E. coli* infection than WT (Flo et al., 2004). Moreover, in human type II pneumocyte cells, NGAL expression is induced by lipopolysaccharide via the TLR4 (Toll-Like Receptor 4), and by IL-1 β , a cytokine involved in inflammatory responses (Flo et al., 2004). A consensus sequence in NGAL gene promoter was found to be a NF- κ B binding site, required for IL-1 β NGAL-induced expression. Together, these elements confer a role for NGAL in immunity. Performing crystallography experiments, Goetz and collaborators have seen that the recombinant NGAL protein displayed a red color in *E. coli* and not in insect cells (Goetz et al., 2002). It turned out that in *E. coli*, NGAL was bound to the enterobactin siderophore and that red color was due to an iron atom carried by the siderophore. Co-crystallization experiments have shown that NGAL binds phenolate and catecholate type siderophores like carboxy-mycobactin siderophores but cannot bind hydroxamate type siderophores (Holmes et al., 2005). NGAL is recognized by a cell receptor called megalin, a receptor of the lipoprotein receptor family, allowing endocytosis in epithelia tissues (Hvidberg et al., 2005). Indeed, NGAL endocytosis is abolished when over-expressing megalin cell lines are treated with an anti-megalin antibody. Megalin has been described as the NGAL receptor in epithelia and permits endocytosis of the siderophore-binding siderocalin (Hvidberg et al., 2005). Willnow and collaborators (1992) showed that megalin is able to bind lactoferrin, an iron-binding protein of the transferrin family and a component of the immunity mainly present in mammalian secretions (Willnow et al., 1992). It is remarkable to observe that a same receptor in different tissues is involved in binding and endocytosis of two elements of both iron metabolism and immunity system. It will be interesting to perform cross-studies of megalin NGAL- and lactoferrin-binding under siderophore treatments in an integrative model.

In mammals, Lcn1 is a protein present in secretions, like tears, and produced in exocrine glands and tissues and in the pituitary gland. This protein is responsible for antimicrobial properties and contributes to epithelia protection by binding lipophilic molecules. While NGAL, was described as displaying some specificity for bacterial catecholate-type siderophores, TL is able to bind a large range of chemically different siderophores (Fluckinger et al., 2004). Lcn1 is able to bind bacterial ferri-siderophores like ferric enterobactin, ferrioxamin B, ferric aerobactin, but also fungal ferri-siderophores: ferrichrocin, ferrichrome, rhodotorulic acid, coprogen and triacetylfusarinine C. In

order to identify Lcn1 interactors, a cDNA bank screening from the pituitary glands was performed by Wojnar et al. (Wojnar, 2001). They have shown that the Lcn1-ferrisiderophore complex can be carried by a transporter called LIMR (Lipocalin-1 Interacting Membrane Receptor) which leads the complex to endocytosis and degradation through the proteasome pathway.

Bacteria have evolved a sophisticated mechanism to overcome recognition of their siderophores by siderocalin (Bister et al., 2004; Fischbach et al., 2006). For instance, enterobactin can be glycosylated at two catechol C-5 positions resulting in loss of binding by siderocalin and thus escaping this immune system. The glycosylated forms of enterobactin are still able to chelate iron and are called salmochelins. These data support the hypothesis of a pathogen-host coevolution around iron acquisition by siderophores. Interestingly, siderocalins loaded with an iron chelator have also been described as being able to contribute to iron traffic in some mammalian cells lines by binding to a membrane receptor then by endocytosis followed by intracellular iron delivery (Devireddy et al., 2005).

In addition to the system developed by animals to bind siderophores, activation of immune responses in response to siderophores has been described. Using HT-29 human intestinal epithelial cells, the effect of DFO on immunity was investigated. Choi et al. have shown that DFO supplementation of the culture medium led to an interleukin (IL)-8 production and secretion. IL-8 protein is a component of innate immunity; in intestinal epithelial cells and during infection its production increases and contributes to neutrophil cells recruitment. This DFO-triggered IL-8 production is mediated by 3 MAPKs: MEK1, ERK1/2 and p38. Actually, MEK1 and ERK1/2 are responsible for AP-1 transcription factor binding on IL-8 gene promoter, leading to gene transcription and mRNA accumulation (Choi et al., 2004; Choi et al., 2007). The p38 protein is involved in p38 mRNA stabilization. To go further, authors performed a microarray analysis revealing that expression of inflammatory-related genes is increased in HT-29 DFO-treated cells compared to untreated cells. In this set of genes is found CCL-20, the Chemokine ligand 20, involved in attraction of immature dendritic cells and T and B cells involved in both innate and acquire immunity of mammals (Choi et al., 2004; Lee et al., 2005).

Siderophores and plant Immune responses.

In the rhizosphere, several bacterial species can be beneficial to plants and protect them against pathogens. This kind of bacteria is called Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and is able to induce systemic resistance (ISR) and/or immunity against pathogens (De Vleeschauwer and Hofte, 2009). Many studies describe the role of siderophores as part of the ISR protective effect and have

been reviewed in excellent reviews (Bakker et al., 2007; De Vleeschauwer and Hofte, 2009). We will only focus on data related to the signaling mechanisms triggered by siderophores in plants.

Pseudomonas aeruginosa 7NSK2 is a non-plant pathogenic soil borne bacterium that produces three siderophores under low iron: pyoverdine, pyochelin and salicylic acid (Buysens et al., 1996). Several studies show that pyochelin is involved in protection against pathogens. For instance, the damping-off caused by the plant pathogen oomycete *Pythium splendens* on tomato can be reduced thanks to the *P. aeruginosa* 7NSK2. On tomato seedlings, a bacterial mutant unable to produce both pyochelin and pyoverdine, is less protective against disease than the WT strain (Buysens et al., 1996). This mutant was complemented for pyochelin production and recovered its protective effect on tomato indicating that pyochelin plays a major role in tomato protection against damping-off. The authors interpret their results by a competition for iron between *P. aeruginosa* and *P. splendens*, but they also suggest the possibility that plant immunity could be stimulated by the siderophores.

Botrytis cinerea causes grey mould on a large range of plant species. Audenaert et al. (2002) have shown that the antibiotic pyocyanin is involved in the protection of tomato against *B. cinerea* and suggest a synergistic effect between pyochelin and pyocyanin leading to accumulation of reactive oxygen species (Audenaert et al., 2002b). Indeed, in porcine endothelial cells, pyochelin was shown to react synergistically with pyocyanin through generation of hydroxyl radicals causing cellular damage (Britigan et al., 1992). Interestingly, petiole infiltration with pyocyanin induces ROS accumulation in leaf. In roots, it is possible that a synergistic action of pyochelin, pyocyanin and Fe-pyochelin occurs and results in a subtle ROS balance modification leading to the tomato resistance to *B. cinerea* (Audenaert et al., 2002b).

Pseudomonas fluorescens WCS374 is able to trigger ISR-mediated resistance on rice against the leaf blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. This PGPR permits a reduction in lesion number on leaves and the emergence of small necrotic spots reflecting the resistance of the plant.

De Vleeschauwer and collaborators (2008) showed that the *Pseudomonas fluorescens* WCS374r pseudobactin (Psb374) was needed to induce ISR-mediated resistance in rice CO39 under *M. oryzae* infection (De Vleeschauwer et al., 2008). The authors performed soil inoculation with a WCS374r pseudobactin deficient mutant strain and 4 to 5 days later they infected rice leaves with *M. oryzae*. They observed no disease suppression on rice with siderophore mutant bacteria compared to wild type *P. fluorescens* strain. To complete this study, they treated roots of rice seedlings hydroponically grown with purified pseudobactin Psb374 prior to *M. oryzae* infection. Purified pseudobactin Psb374 applied to the root system led to protection of rice seedlings although it was not as effective as the benzothiadiazole (BTH) compound used as a positive control. The authors biochemically and

cytologically characterized the defense mechanisms triggered by pseudobactin. Root treatment with pseudobactin Psb374 resulted in the priming of leaves for accelerated expression of defense responses including a rapid recruitment of phenolic compounds at sites of pathogen entry, and increased accumulation of hydrogen peroxide. To further characterize the signaling pathways involved in the immunity triggered by Psb374, the authors investigated the involvement of the defense hormones salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET). They show that the protective effect of Psb374 requires ET and JA and not SA. Rather, SA seems to antagonize pseudobactin Psb374 effect. Taken together, these data clearly demonstrate an ET/JA dependent priming of plant defenses in aerial parts conferred by Psb374 roots treatment, involving unknown molecular partners to transduce siderophore triggered signal from root to shoot.

Most reports indicate that ISR triggered by siderophores does not involve SA but rather involves ET and JA (De Vleeschauwer and Hofte, 2009). Interestingly, *P. fluorescens* WCS417r and CHAO needed intact SA production to induce ISR but did not require plant SA production since SA deficient *nahG* expressing plants were still able to mount ISR (Ran et al., 2005). On hypothesis from these results is that SA released in the rhizosphere and is channeled towards biosynthesis of pyochelin and pyocyanin as a precursor instead of acting as an immunity signal in the plant.

To further decipher the mechanism responsible for immunity activation during ISR, van Loon et al analyzed molecular immunity markers on cell cultures. Rhizobacteria can trigger ISR on different plant species including model plants like *A. thaliana* or tobacco. To test the involvement of siderophore to elicit this defense process, a study with purified pseudobactin from *P. fluorescens* WCS417, WCS374 and *P. putida* WCS358 strains was performed on tobacco cells and was compared to other well-known elicitors : cryptogein and cell extracts containing LPS (van Loon et al., 2008). Addition of purified pseudobactin from WCS417 or WCS358 strains to cell culture medium did not triggered ROS burst nor increase cytoplasmic Ca^{2+} , while pseudobactin from WCS374 did as cell wall extracts containing LPS from the same strain. This result suggests that pseudobactin and LPS from WCS374 partially share a common signalization pathway to trigger ROS generation in tobacco cells. Interestingly, authors tested the ability of cells to answer to a second stimulation: they first monitored ROS accumulation of Psb374 or cell wall extracts treated cells, and then they applied respectively cell wall extracts or Psb374 treatments on the same cellular culture. When Psb374 is applied first, cells are able to generate a second oxidative burst in response to cell wall extracts. Contrariwise, tobacco cells are unable to trigger a second ROS burst when they are challenged first with cell wall extracts and then with Psb374. (This could explain why plants treated with siderophore deficient strains or WT strains of *Pseudomonas* spp. do not show difference in ROS generation.). To go further, addition of EGTA, $LaCl_2$ or DPI allowed to assign a role of phosphorylation events, Ca^{2+}

influx and NADPH oxidase activity in the oxidative burst generation dependent on Psb374. Induction of *PAL*, *LOX* and *GST* genes, defense-related gene expression following Psb374 cells treatment is consistent with increase immunity. To confirm the ability of pseudobactin in tobacco protection under pathogen infection, root treatment with WCS strains or pseudobactin were performed prior the leaves infiltration with the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*. Reduction in symptoms severity was only observed with the *P. putida* WCS358 strain while purified pseudobactin from the three strains conferred plant protection. This study shows that typical immune responses can be detected at the cellular level in plant cells and that this can be correlated to a protective effect. Together these data show that siderophores can trigger immune responses at the root and the cellular level.

Siderophores can also be produced by microbes that colonize aerial parts of the plant. Interestingly, *Pseudomonas fluorescens* species can also trigger ISR on *Eucalytus urophylla* against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Pre-infiltration of *E. urophylla* leaves with WCS358 and WCS374r strains prior to an infection with *Ralstonia solanacearum* lead to ISR-mediated resistance of the plant. Using pseudobactin deficient mutants and purified pseudobactin, the authors concluded that pseudobactin can induce ISR but it is not the only bacterial determinant of WCS374r strain able to trigger the systemic resistance against *R. solanacearum* bacterial wilt.

To further decipher the molecular mechanisms involved in siderophore mediated immunity in leaves, our group extensively studied the plant immune responses triggered by the siderophore deferroxamine (DFO) and chrysobactine (CB) in *A. thaliana*. Using several strong iron chelators including microbial siderophores (deferrioxamine, chrysobactin, ferrichrome) and a synthetic molecule the ethylenediamine-di(o-hydroxyphenylacetic) acid (EDDHA) which is not a natural product but usually used as a fertilizer of plants in its Fe-EDDHA form (Sequestrene®), these reports showed clearly that iron scavenging triggers immune responses (Dellagi et al., 2009; Aznar et al., 2014). Consistently, leaf treatment with ferri-siderophores failed to activate immunity responses. These data raised the question of the mechanism by which siderophores activate immunity.

To address this question the physiological processes triggered by the siderophore DFO was investigated with no a priori assumption, using microarrays. Iron homeostasis was expected to be the most important process modulated by this highly specific iron chelator, and that immunity would be a minor response. Surprisingly, plant immunity appeared to be the most important physiological process activated by the DFO in leaves. In roots, the major process being activated is heavy metal homeostasis. Siderophore treatment clearly mimics a biotic stress as demonstrated by a comparison of the transcriptional profiles of the leaf's response to siderophore with the "Signature tool" of

genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/doc/signature.jsp>). This was validated by showing accumulation of reactive oxygen species and of the defense hormones SA and JA in treated leaves. Cell wall rigidification was observed through accumulation of callose along leaf vascular system. This pattern of callose deposition differs from the well-described pattern triggered by pathogens and microbial associated molecular patterns (MAMP), which appears in the inter-vein zone. Consistently, plant protection against the pathogenic bacterium *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 was observed in siderophore treated leaves.

Several genes known to be up-regulated under iron deficiency are up-regulated upon siderophore treatment. These data suggested that modification in iron homeostasis occurs in response to siderophores. For instance, the ferritin coding gene is down regulated early after siderophore treatment as a result of a primary “iron deficiency” like event, and is up-regulated at later times (24h after treatment) indicating iron influx in the cell or oxidative stress. Metal quantification in roots of treated plants showed an increase in iron and zinc concentration indicating that siderophores modify heavy metal content in the plant. Interestingly, in leaves, no modification in metal content was visible. However, iron distribution visualized by Perls'-DAB-H₂O₂ staining indicated that siderophores provoked accumulation of iron in cell walls and depletion in plasts. Thus siderophores trigger strong perturbations of heavy metal distribution in the plant (Aznar et al., 2014).

These data suggested that immunity activated by siderophores is mediated through modified iron or other metal homeostasis. This hypothesis was confirmed by several experiments. Indeed, siderophore treatment of iron deficient plants failed to induce the expression of immune markers (Dellagi et al., 2009). In addition in an *irt1* mutant affected in the uptake of several metals (Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺) including iron, siderophores were unable to trigger the immune responses observed in the WT (Aznar et al., 2014).

Discussion

From this review it can be highlighted that siderophores have potentially two opposite functions during infection processes being both pathogenesis effectors involved in host invasion, and defense elicitors. This dual property is also found in some protein effectors secreted by bacterial and fungal pathogens (Bent and Mackey, 2007).

First, we have seen how mammals can neutralize iron theft from pathogens. Indeed, siderocalins prevent certain ferri-siderophores to return to microbes thus limiting their iron nutrition. However, microorganisms often have more than one siderophore leaving them effective. A co-evolution

between siderophores and mammalian molecule scavenging siderophores has been noticed. *E. coli* produces salmochelin siderophore differing from enterobactin by glycosylation and which cannot be bound by siderocalin. No homolog of siderocalin is known in plants, it is still possible that another protein could play a similar role.

Siderophores have been described for a long time as contributing to the ISR triggered by PGPR. However, apart from a nutritional competition effect with pathogens, little information is available concerning the underlying mechanisms involving the plant's metabolism. In this report, we discussed siderophores contribution to immunity responses, not in limiting iron availability to pathogen organisms, but in triggering defenses in the plant.

Concerning the underlying mechanisms of immunity activation in plants, oxidative stress was reported in several instances. Indeed, a combination of pyochelin and pyocyanin was suggested to trigger immunity owing to ROS production (Audenaert et al., 2002b). In tobacco cell cultures, ROS production was observed with the siderophore Psb374. And in *A. thaliana*, siderophores were shown to provoke ROS accumulation and differential expression of ROS metabolism linked genes. Modifications in the redox balance is proposed to explain immunity events, reactive oxygen species as H_2O_2 could be the plant circulating molecule provoking a systemic spreading of defense initiation. ROS production could be due to a Fenton effect generated by a strong and rapid modification of iron distribution at the cell level and at the plant level.

Another process could be involved in activation of immunity responses is the modified stoichiometric balance between metals. If some proteins can bind a set of metals and if perturbation of the metal balance occurs, the bound metal could change (for example Zn^{2+} replaces Fe^{2+}) resulting in a “danger signal”. This danger signal could be detected like it is the case for the detection of pathogen effectors that are injected in eukaryotic cells to modify their metabolism (Block et al., 2008). Detection of such effectors strongly activates immune responses and hypersensitive response cell death. In the case of siderophores, no cell death was reported. However, the fact that the transcriptome signature of the deferrioxamine treated leaves is similar to several plant-pathogen interactions could indicate that the signaling cascade activated following siderophore detection is similar to that of a pathogen detection. Indeed; Dellagi et al. (2009) showed that SA pathway defense markers up-regulation depends on the protein *NPR1*, *EDS5* and *SID2*, which are known to be major regulators of the plant's response to pathogens (Derksen et al., 2013). One hypothesis is that, like it is the case for pathogen effectors, siderophores could target the activity of a protein, in this case possibly a metallo-protein, which could then be modified. If this target protein is guarded by a resistance like protein such as those of the NB-LRR family, then immune responses will be activated. The hypothesis of a danger

signal is comforted by the observation that immune responses are active only when the siderophore concentration in the leaf is equivalent to iron concentration (100 μ M). Under this concentration, immune responses are not activated suggesting that the plant can buffer the presence of strong iron scavengers up to a certain level which corresponds to its iron content. Above this level, the “danger signal” must be activated. Activation of the “danger signal” by the siderophore must be accompanied by iron mobilization via *IRT1* because in an *irt1* mutant, no immune responses can be observed. Thus, the effect of siderophore on immunity is a combination of a local perturbation of iron distribution in leaves and iron and possible other heavy metals uptake.

Future prospects:

An important lacking information is the exact localization of siderophores in the plants tissues. We have discussed reports on immunity activation by siderophores applied to leaves or to roots. Vansuyt et al, showed that pyoverdine can be taken up at the root level into the plant via an *IRT1* independent system (Vansuyt et al., 2007). In general, it would be useful to determine the exact localization of siderophores to find their target and further characterize the mechanism by which they activate immunity. One possibility is that siderophores trigger immunity than could be degraded. It would be interesting to analyze using chemical methods the half live of siderophores in plant tissues. In the environment, plants can be exposed to a variety to microbes that can be beneficial or pathogenic. All these microbes are likely to produce siderophores. The relative stability and iron affinity of these siderophores could play an important role in plant health. In addition, siderophore production is also important during symbiosis, it would be worth investigating whether in this context a manipulation of immunity is occurring (Johnson, 2008). Together these reports show that siderophores can cause important physiological modifications in plants a better understanding of their effect would provide valuable data to design new crop protection strategies.

BIBLIOGRAPHIE

Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang Y-S, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR, Andrews SC (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**: 1415–1428

Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* **15**: 2816–2825

Ahn JH, Walton JD (1996) Chromosomal organization of TOX2, a complex locus controlling host selective toxin biosynthesis in *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* **8**: 887–897

Ahuja I, Kissen R, Bones AM (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* **17**: 73–90

Almiron M, Link AJ, Furlong D, Kolter R (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**: 2646–2654

An C, Mou Z (2011) Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *J Integr Plant Biol* **53**: 412–428

Anderson CM, Wagner TA, Perret M, He ZH, He DZ, Kohorn BD (2001) WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol Biol* **47**: 197–206

Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* **1823**: 1468–1483

Anderson JC, Bartels S, Besteiro MAG, Shahollari B, Ulm R, Peck SC (2011) *Arabidopsis* MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *Plant J* **67**: 258–268

Andrews SC, Robinson AK, Rodr  guez-Qui  ones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237

Antunez-Lamas M, Cabrera E, Lopez-Solanilla E, Solano R, Gonzalez-Melendi P, Manuel Chico J, Toth I, Birch P, Prichard L, Liu H, et al (2009) Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Mol Microbiol* **74**: 662–671

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977–983

Askwith CC, de Silva D, Kaplan J (1996) Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **20**: 27–34

Asselbergh B, Curvers K, Franca SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Hoes   M (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol* **144**: 1863–1877

Attaran E, Zeier TE, Griebel T, Zeier J (2009) Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 954–971

- Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM** (2002a) Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol* **128**: 491–501
- Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, Höfte M** (2002b) Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1147–1156
- Aznar A, Chen NWG, Rigault M, Riache N, Joseph D, Desmaële D, Mouille G, Boutet S, Soubigou-Taconnat L, Renou J-P, et al** (2014) Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores. *Plant Physiol*. doi: 10.1104/pp.113.233585
- Bagg A, Neilands JB** (1985) Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **161**: 450
- Bakker PA, Pieterse CM, Van Loon LC** (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239–243
- Bannenberg G, Martinez M, Hamberg M, Castresana C** (2009) Diversity of the Enzymatic Activity in the Lipoxxygenase Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* **44**: 85–95
- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conejero G, Curie C, Friml J, Vert G** (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E450–E458
- Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, Nagasaka S, Fujimoto M, Takanashi H, Tsutsumi N, An G, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat Commun* **2**: 322
- Bauer D, Bogdanove A, Beer S, Collmer A** (1994) *Erwinia chrysanthemi* hrp genes and their involvement in soft-rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 573–581
- Bauer P, Thiel T, Klatte M, Berezsky Z, Brumbarova T, Hell R, Grosse I** (2004) Analysis of sequence, map position, and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol* **136**: 4169–4183
- Benès I, Schreiber K, Ripberger H, Kircheiss A** (1983) Metal complex formation by nicotianamine, a possible phytosiderophore. *Experientia* **39**: 261–262
- Bent AF, Mackey D** (2007) Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* pp 399–436
- Berriri S, Garcia AV, Frey NFD, Rozhon W, Pateyron S, Leonhardt N, Montillet J-L, Leung J, Hirt H, Colcombet J** (2012) Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Versions Reveal Functions of *Arabidopsis* MPK4 in Pathogen Defense Signaling. *Plant Cell* **24**: 4281–4293
- Bethke G, Pecher P, Eschen-Lippold L, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J, Scheel D, Lee J** (2012) Activation of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 471–480

- Bethke G, Unthan T, Uhrig JF, Poeschl Y, Gust AA, Scheel D, Lee J** (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.0810206106
- Bister B, Bischoff D, Nicholson GJ, Valdebenito M, Schneider K, Winkelmann G, Hantke K, Sussmuth RD** (2004) The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* **17**: 471–481
- Block A, Li G, Fu ZQ, Alfano JR** (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396–403
- Boccara M, Aymeric J, Camus C** (1994) Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi*-3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J Bacteriol* **176**: 1524–1526
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U** (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**: 1509–1512
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J** (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* **464**: 418–U116
- Boughammoura A, Expert D, Franza T** (2011) Role of the *Dickeya dadantii* Dps protein. *BioMetals* **25**: 423–433
- Boughammoura A, Matzanke BF, Bottger L, Reverchon S, Lesuisse E, Expert D, Franza T** (2007) Differential Role of Ferritins in Iron Metabolism and Virulence of the Plant-Pathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **190**: 1518–1530
- Boukhalfa H, Crumbliss AL** (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**: 325–339
- Boutrot F, Segonzac C, Chang KN, Qiao H, Ecker JR, Zipfel C, Rathjen JP** (2010) Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14502–14507
- Braun V, Hantke K** (2011) Recent insights into iron import by bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **15**: 328–334
- Briat J-F, Curie C, Gaymard F** (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 276–282
- Briat J-F, Duc C, Ravet K, Gaymard F** (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1800**: 806–814
- Briat JF, Lobreaux S** (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 187–193
- Brisson L, Tenhaken R, Lamb C** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell-wall structural proteins in plant-disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703–1712
- Britigan B, Roeder T, Rasmussen G, Shasby D, McCormick M, Cox C** (1992) Interaction of the *Pseudomonas-aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage. *J Clin Invest* **90**: 2187–2196

- Brosch G, Ramsom R, Lechner T, Walton J, Loidl P** (1995) Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus-carbonum*. *Plant Cell* **7**: 1941–1950
- Le Brun NE** (1995) Site-directed Replacement of the Coaxial Heme Ligands of Bacterioferritin Generates Heme-free Variants. *J Biol Chem* **270**: 23268–23274
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G** (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9452–9457
- Bruyneel B, Vande Woestyne M, Verstraete W** (1989) Lactic acid bacteria: micro-organisms able to grow in the absence of available iron and copper. *Biotechnol Lett* **11**: 401–406
- Van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, de Wit PJGM** (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects Fungal Cell Walls Against Hydrolysis by Plant Chitinases Accumulating During Infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1420–1430
- Buysens S, Heungens K, Poppe J, Hofte M** (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol* **62**: 865–871
- Canessa P, Larrondo LF** (2012) Environmental responses and the control of iron homeostasis in fungal systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 939–955
- Cao H, Bowling S, Gordon A, Dong X** (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired-resistance. *Plant Cell* **6**: 1583–1592
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong XN** (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57–63
- Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC** (2006) Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *BioMetals* **19**: 143–157
- Caza M, Kronstad JW** (2013) Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: UNSP 80
- Challis GL** (2005) A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **6**: 601–611
- Chao QM, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR** (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**: 1133–1144
- Chen F, D’Auria JC, Tholl D, Ross JR, Gershenzon J, Noel JP, Pichersky E** (2003) An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J* **36**: 577–588
- Chen H, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H, Cui H, Cai R, Zuo J, Tang X, Li X, et al** (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2527–2540

- Chen S, Beeby M, Murphy GE, Leadbetter JR, Hendrixson DR, Briegel A, Li Z, Shi J, Tocheva EI, Mueller A, et al** (2011) Structural diversity of bacterial flagellar motors. *Embo J* **30**: 2972–2981
- Chen WW, Yang JL, Qin C, Jin CW, Mo JH, Ye T, Zheng SJ** (2010) Nitric Oxide Acts Downstream of Auxin to Trigger Root Ferric-Chelate Reductase Activity in Response to Iron Deficiency in Arabidopsis. *PLANT Physiol* **154**: 810–819
- Chen X-Y, Kim J-Y** (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav* **4**: 489–492
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nuernberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–U12
- Choi EY, Kim EC, Oh HM, Kim S, Lee HJ, Cho EY, Yoon KH, Kim EA, Han WC, Choi SC, et al** (2004) Iron chelator triggers inflammatory signals in human intestinal epithelial cells: involvement of p38 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J Immunol* **172**: 7069–7077
- Choi E-Y, Park Z-Y, Choi E-J, Oh H-M, Lee S, Choi S-C, Lee K-M, Im S-H, Chun J-S, Jun C-D** (2007) Transcriptional regulation of IL-8 by iron chelator in human epithelial cells is independent from NF- κ B but involves ERK1/2- and p38 kinase-dependent activation of AP-1. *J Cell Biochem* **102**: 1442–1457
- Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek K-H, Hwang I** (2010) The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling in Arabidopsis. *Dev Cell* **19**: 284–295
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Cockrell AL, Holmes-Hampton GP, McCormick SP, Chakrabarti M, Lindahl PA** (2011) Mossbauer and EPR Study of Iron in Vacuoles from Fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* **50**: 10275–10283
- Colangelo EP** (2004) The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response. *PLANT CELL ONLINE* **16**: 3400–3412
- Colcombet J, Hirt H** (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* **413**: 217
- Condemine G, Castillo A, Passeri F, Enard C** (1999) The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 45–52
- Cornelis P, Dingemans J** (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 75
- Crichton R** (2002) Solution Chemistry of Iron in Biological Media. *Inorg. Biochem. Iron Metab.* John Wiley & Sons, Ltd, pp 1–15
- Crosa JH, Walsh CT** (2002) Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 223–249

- Cunnac S, Wilson A, Nuwer J, Kirik A, Baranage G, Mudgett MB** (2007) A conserved carboxylesterase is a SUPPRESSOR OF AVRBS1-ELICITED RESISTANCE in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 688–705
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2008) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* **103**: 1–11
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346–349
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP** (2012) The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity. *Plant Cell* **24**: 275–287
- Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithoefer A, Shetty SH** (2010) Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. *J Phytopathol* **158**: 585–593
- Delany I, Rappuoli R, Scarlato V** (2004) Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*: Regulatory role of Fur in *N. meningitidis*. *Mol Microbiol* **52**: 1081–1090
- Dellagi A, Brisset MN, Paulin JP, Expert D** (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 734–742
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat J-F, Gaymard F, Expert D** (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection: Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin. *Plant J* **43**: 262–272
- Dellagi A, Segond D, Rigault M, Fagard M, Simon C, Saindrenan P, Expert D** (2009) Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *PLANT Physiol* **150**: 1687–1696
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J** (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol Plant* **1**: 423–445
- Derksen H, Rampitsch C, Daayf F** (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci* **207**: 79–87
- Devireddy LR, Gazin C, Zhu XC, Green MR** (2005) A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* **123**: 1293–1305
- DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL** (2004) *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)* : a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* **39**: 403–414
- Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J, Benfey PN** (2008) Cell Identity Mediates the Response of Arabidopsis Roots to Abiotic Stress. *Science* **320**: 942–945
- Diolez A, Coleno A** (1985) MU-LAC insertion-directed mutagenesis in a pectate lyase gene of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* **163**: 913–917

- Divi UK, Rahman T, Krishna P** (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *Bmc Plant Biol* **10**: 151
- Divol F, Couch D, Conejero G, Roschztardt H, Mari S, Curie C** (2013) The *Arabidopsis* YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 Transporters Control Iron Release from the Chloroplast. *Plant Cell* **25**: 1040–1055
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ** (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe (II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 26092–26099
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843–847
- Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy ASN, Poovaiah BW** (2009) Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457**: 1154–U116
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE** (2007) The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation. *PLANT Physiol* **144**: 197–205
- Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wiren N, Soll J, Philipp K** (2007) PIC1, an Ancient Permease in *Arabidopsis* Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *PLANT CELL ONLINE* **19**: 986–1006
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 5624–5628
- Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, Muller D, Illmer P, Haas H** (2006) The Intracellular Siderophore Ferricrocin Is Involved in Iron Storage, Oxidative-Stress Resistance, Germination, and Sexual Development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **5**: 1596–1603
- Elmore JM, Lin Z-JD, Coaker G** (2011) Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 365–371
- Enard C, Diolez A, Expert D** (1988) Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J Bacteriol* **170**: 2419–2426
- Eschen-Lippold L, Bethke G, Palm-Forster MA, Pecher P, Bauer N, Glazebrook J, Scheel D, Lee J** (2012) MPK11—a fourth elicitor-responsive mitogen-activated protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **7**: 1203–1205
- Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V** (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223–6229
- Van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJGM, Thomma BPHJ** (2007) The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1092–1101
- Expert D** (1999) Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annu Rev Phytopathol* **37**: 307–334
- Expert D, Boughammoura A, Franza T** (2008) Siderophore-controlled Iron Assimilation in the Enterobacterium *Erwinia chrysanthemi*: EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF BACTERIOFERRITIN AND THE Suf IRON-SULFUR CLUSTER ASSEMBLY MACHINERY. *J Biol Chem* **283**: 36564–36572

- Expert D, Dellagi A, Kachadourian R** (2000) Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. Cabi, Wallingford, UK
- Fagard M, Dellagi A, Roux C, Périno C, Rigault M, Boucher V, Shevchik VE, Expert D** (2007) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 794–805
- Faulkner C, Robatzek S** (2012) Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 699–707
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**: 265–276
- Feng F, Zhou J-M** (2012) Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Biot Interact* **15**: 469–476
- Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, et al** (2006) The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16502–16507
- Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A** (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**: 917–921
- Fluckinger M, Haas H, Merschak P, Glasgow BJ, Redl B** (2004) Human Tear Lipocalin Exhibits Antimicrobial Activity by Scavenging Microbial Siderophores. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3367–3372
- Forbes JR, Gros P** (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **9**: 397–403
- Franceschi VR, Tarlyn NM** (2002) L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol* **130**: 649–656
- Franza T, Enard C, van Gijsegem F, Expert D** (1991) Genetic analysis of the *Erwinia chrysanthemi* 3937 chrysobactin iron-transport system: characterization of a gene cluster involved in uptake and biosynthetic pathways. *Mol Microbiol* **5**: 1319–1329
- Franza T, Expert D** (2013) Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an “à la carte” menu: Fe homeostasis and bacterial phytopathogenicity. *Mol Plant Pathol* **14**: 429–438
- Franza T, Expert D** (1991) The virulence-associated chrysobactin iron uptake system of *Erwinia chrysanthemi* 3937 involves an operon encoding transport and biosynthetic functions. *J Bacteriol* **173**: 6874–6881
- Franza T, Mahe B, Expert D** (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* **55**: 261–275
- Franza T, Sauvage C, Expert D** (1999) Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 119–128

- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 839–863
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, et al** (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*. doi: 10.1038/nature11162
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic-acid for the induction of systemic acquired-resistance. *Science* **261**: 754–756
- García MJ, Suárez V, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R** (2011) A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant Physiol Biochem* **49**: 537–544
- Garénaux A, Caza M, Dozois CM** (2011) The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **153**: 89–98
- Giehl RFH, Lima JE, von Wiren N** (2012) Localized Iron Supply Triggers Lateral Root Elongation in Arabidopsis by Altering the AUX1-Mediated Auxin Distribution. *Plant Cell* **24**: 33–49
- Glasner JD, Yang C-H, Reverchon S, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Bohin J-P, Van Gijsegem F, Yang S, Franza T, Expert D, et al** (2011) Genome Sequence of the Plant-Pathogenic Bacterium *Dickeya dadantii* 3937. *J Bacteriol* **193**: 2076–2077
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227
- Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK** (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**: 1033–1043
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: An LRR receptor–like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* **5**: 1003–1011
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **18**: 277–284
- Gray-Owen SD, Schyvers AB** (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**: 185–191
- Graziano M, Lamattina L** (2007) Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *Plant J* **52**: 949–960
- Green LS** (2004) FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. *PLANT Physiol* **136**: 2523–2531
- De Groot PWJ, Hellingwerf KJ, Klis FM** (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**: 781–796
- Gupta UC, Gupta SC** (2014) Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. *Pedosphere* **24**: 13–38

- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG** (2008) Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 149–187
- Hantke K** (2003) Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* **11**: 192–195
- Hantke K** (1987) Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* **44**: 53–57
- Hassan S, Shevchik VE, Robert X, Hugouvieux-Cotte-Pattat N** (2013) PelN Is a New Pectate Lyase of *Dickeya dadantii* with Unusual Characteristics. *J Bacteriol* **195**: 2197–2206
- Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, Kondo M, Fuji K, Ogasawara K, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev* **23**: 2496–2506
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099–1103
- Heath MC** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 315–319
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12217–12222
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**: 819–832
- Hematy K, Cherk C, Somerville S** (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 406–413
- Hindt MN, Guerinot ML** (2012) Getting a sense for signals: Regulation of the plant iron deficiency response. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1823**: 1521–1530
- Holmes MA, Paulsene W, Jide X, Ratledge C, Strong RK** (2005) Siderocalin (Lcn 2) Also Binds Carboxymycobactins, Potentially Defending against Mycobacterial Infections through Iron Sequestration. *Structure* **13**: 29–41
- Hommais F, Oger-Desfeux C, Van Gijsegem F, Castang S, Ligor S, Expert D, Nasser W, Reverchon S** (2008) PecS Is a Global Regulator of the Symptomatic Phase in the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **190**: 7508–7522
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yen Y, Yu H** (2010) DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Dev Cell* **19**: 884–894
- Hückelhoven R** (2007) Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 101–127
- Hueckelhoven R, Panstruga R** (2011) Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 738–746

- Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N** (2005) The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* **579**: 773–777
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**: 301–308
- Iizasa E, Mitsutomi M, Nagano Y** (2009) Direct Binding of a Plant LysM Receptor-like Kinase, LysM RLK1/CERK1, to Chitin in Vitro. *J Biol Chem* **285**: 2996–3004
- Ishimaru Y, Kakei Y, Shimo H, Bashir K, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2011) A Rice Phenolic Efflux Transporter Is Essential for Solubilizing Precipitated Apoplasmic Iron in the Plant Stele. *J Biol Chem* **286**: 24649–24655
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsushashi S, Takahashi M, et al** (2006) Rice plants take up iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} . *Plant J* **45**: 335–346
- Ito Y, Kaku H, Shibuya N** (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* **12**: 347–356
- Jahn CE, Selimi DA, Barak JD, Charkowski AO** (2011) The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon. *Microbiol-Sgm* **157**: 2733–2744
- Jakoby M, Wang H-Y, Reidt W, Weisshaar B, Bauer P** (2004) FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **577**: 528–534
- Jean ML, Schikora A, Mari S, Briat J-F, Curie C** (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading: Loading of Fe and NA into seeds requires AtYSL1. *Plant J* **44**: 769–782
- Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML** (2008) Chloroplast Fe (III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 10619–10624
- Jiang D, Liang J, Noble PW** (2011) Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiol Rev* **91**: 221–264
- Jirage D, Tootle TL, Reuber TL, Frost LN, Feys BJ, Parker JE, Ausubel FM, Glazebrook J** (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13583–13588
- Johnson L** (2008) Iron and siderophores in fungal–host interactions. *Mycol Res* **112**: 170–183
- Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA** (2008) Iron-Regulated Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Newman Requires *ica* and the Secreted Protein Emp. *Infect Immun* **76**: 1756–1765
- Johnson M, Cockayne A, Williams PH, Morrissey JA** (2005) Iron-Responsive Regulation of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Involves Fur-Dependent and Fur-Independent Mechanisms. *J Bacteriol* **187**: 8211–8215

- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- De Jonge R, Peter van Esse H, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ** (2010) Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* **329**: 953–955
- Jung WH, Sham A, White R, Kronstad JW** (2006) Iron Regulation of the Major Virulence Factors in the AIDS-Associated Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol* **4**: e410
- Jung Y-H, Jeong S-H, Kim SH, Singh R, Lee J, Cho Y-S, Agrawal GK, Rakwal R, Jwa N-S** (2012) Secretome analysis of *Magnaporthe oryzae* using in vitro systems. *Proteomics* **12**: 878–900
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 11086–11091
- Kamoun S** (2001) Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 295–300
- Kankanala P, Czymmek K, Valent B** (2007) Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* **19**: 706–724
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U** (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651
- Kazemi-Pour N, Condemine G, Hugouvieux-Cotte-Pattat N** (2004) The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* **4**: 3177–3186
- Kieu NP, Aznar A, Segond D, Rigault M, Simond-Côte E, Kunz C, Soulie M-C, Expert D, Dellagi A** (2012) Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*: Plant iron deficiency and resistance to pathogens. *Mol Plant Pathol* **13**: 816–827
- Kim SA, Guerinot ML** (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* **581**: 2273–2280
- Kirik A, Mudgett MB** (2009) SOBER1 phospholipase activity suppresses phosphatidic acid accumulation and plant immunity in response to bacterial effector AvrBsT. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 20532–20537
- Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P** (2009) The Analysis of Arabidopsis Nicotianamine Synthase Mutants Reveals Functions for Nicotianamine in Seed Iron Loading and Iron Deficiency Responses. *Plant Physiol* **150**: 257–271
- Kobayashi T, Itai RN, Aung MS, Senoura T, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2012) The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status: IDEF1 binds to and sense iron and other metals. *Plant J* **69**: 81–91
- Kobayashi T, Itai RN, Ogo Y, Kakei Y, Nakanishi H, Takahashi M, Nishizawa NK** (2009) The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes: IDEF1 functions in early response to Fe deficiency. *Plant J* **60**: 948–961

- Kobayashi T, Nishizawa NK** (2012) Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 131–152
- Kobayashi T, Ogo Y, Aung MS, Nozoye T, Itai RN, Nakanishi H, Yamakawa T, Nishizawa NK** (2010) The spatial expression and regulation of transcription factors IDEF1 and IDEF2. *Ann Bot* **105**: 1109–1117
- Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK** (2007) The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19150–19155
- Koen E, Besson-Bard A, Duc C, Astier J, Gravot A, Richaud P, Lamotte O, Boucherez J, Gaymard F, Wendehenne D** (2013) *Arabidopsis thaliana* nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure. *Plant Sci* **209**: 1–11
- Kohli RM, Trauger JW, Schwarzer D, Marahiel MA, Walsh CT** (2001) Generality of Peptide Cyclization Catalyzed by Isolated Thioesterase Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases[†]. *Biochemistry (Mosc)* **40**: 7099–7108
- Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J* **39**: 415–424
- Kombrink A, Sánchez-Vallet A, Thomma BPHJ** (2011) The role of chitin detection in plant–pathogen interactions. *Microbes Infect* **13**: 1168–1176
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37–44
- Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, Colcombet J, Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Hirt H, Machida Y** (2010) The MAP Kinase MPK4 Is Required for Cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLANT CELL ONLINE* **22**: 3778–3790
- Krewulak KD, Vogel HJ** (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1778**: 1781–1804
- Kruger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R** (2002) A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* **277**: 25062–25069
- Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T, Shibuya N** (1995) EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by n-acetylchitoooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* **188**: 138–142
- Kurusu T, Hamada J, Nokajima H, Kitagawa Y, Kiyoduka M, Takahashi A, Hanamata S, Ohno R, Hayashi T, Okada K, et al** (2010) Regulation of Microbe-Associated Molecular Pattern-Induced Hypersensitive Cell Death, Phytoalexin Production, and Defense Gene Expression by Calcineurin B-Like Protein-Interacting Protein Kinases, OsCIPK14/15, in Rice Cultured Cells. *Plant Physiol* **153**: 678–692

- Kwok EY, Severance S, Kosman DJ** (2006) Evidence for Iron Channeling in the Fet3p–Ftr1p High-Affinity Iron Uptake Complex in the Yeast Plasma Membrane [†]. *Biochemistry (Mosc)* **45**: 6317–6327
- Lagaert S, Beliën T, Volckaert G** (2009) Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Syst Biol Plant-Pathog Interact Stem Cell Niches Plants Anim* **20**: 1064–1073
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, et al** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo J* **24**: 4041–4051
- Lau CKY, Ishida H, Liu Z, Vogel HJ** (2013) Solution Structure of Escherichia coli FeoA and Its Potential Role in Bacterial Ferrous Iron Transport. *J Bacteriol* **195**: 46–55
- Lee CG, Da Silva CA, Lee J-Y, Hartl D, Elias JA** (2008) Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr Opin Immunol* **20**: 684–689
- Lee HJ, Choi SC, Choi EY, Lee MH, Seo GS, Kim EC, Yang BJ, Lee MS, Shine YI, Park KI, et al** (2005) Iron chelator induces MIP-3 α /CCL20 in human intestinal epithelial cells: implication for triggering mucosal adaptive immunity. *Exp Mol Med* **37**: 297–310
- Leipe DD, Koonin EV, Aravind L** (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol.* doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.023
- Lepoivre P** (2003) *Phytopathologie. Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, 1re Edition. De Boeck
- Li J, Wen JQ, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC** (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213–222
- Li L** (2001) CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *J Biol Chem* **276**: 29515–29519
- Li Y, Zhang Q, Zhang J, Wu L, Qi Y, Zhou J-M** (2010) Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiol* **152**: 2222–2231
- Ling H-Q, Bauer P, Bereczky Z, Keller B, Ganai M** (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 13938–13943
- Ling H-Q, Koch G, Bäumlein H, Ganai MW** (1999) Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 7098–7103
- Lingam S, Mohrbacher J, Brumbarova T, Potuschak T, Fink-Straube C, Blondet E, Genschik P, Bauer P** (2011) Interaction between the bHLH Transcription Factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Reveals Molecular Linkage between the Regulation of Iron Acquisition and Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1815–1829

- Liu G, Greenshields DL, Sammynaiken R, Hirji RN, Selvaraj G, Wei Y** (2007) Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *J Cell Sci* **120**: 596–605
- Liu J, Elmore JM, Lin Z-JD, Coaker G** (2011) A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Phosphorylates the Host Target RIN4, Leading to the Activation of a Plant Innate Immune Receptor. *Cell Host Microbe* **9**: 137–146
- Liu T, Liu Z, Song C, Hu Y, Han Z, She J, Fan F, Wang J, Jin C, Chang J, et al** (2012) Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* **336**: 1160–1164
- Liu YD, Zhang SQ** (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3386–3399
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN** (2010) The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in Arabidopsis Roots. *PLANT CELL ONLINE* **22**: 2219–2236
- Van Loon LC, Bakker PA, van der Heijdt WH, Wendehenne D, Pugin A** (2008) Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1609–1621
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* pp 135–162
- Lopez-Solanilla E, Garcia-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P** (1998) Inactivation of the sapA to sapF locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**: 917–924
- Lord CEN, Gunawardena AHLAN** (2012) Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *Eur J Cell Biol* **91**: 603–613
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2004) Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938–1950
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178
- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 496–501
- Lucena C, Waters BM, Javier Romera F, Garcia MJ, Morales M, Alcantara E, Perez-Vicente R** (2006) Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H⁺-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. *J Exp Bot* **57**: 4145–4154
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J** (2012) Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol* **158**: 844–853
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J** (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 183–193

- Ma W, Dong FFT, Stavrinides J, Guttman DS** (2006) Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *Plos Genet* **2**: 2131–2142
- Maekawa T, Cheng W, Spiridon LN, Toeller A, Lukasik E, Saijo Y, Liu P, Shen Q-H, Micluta MA, Somssich IE, et al** (2011) Coiled-Coil Domain-Dependent Homodimerization of Intracellular Barley Immune Receptors Defines a Minimal Functional Module for Triggering Cell Death. *Cell Host Microbe* **9**: 187–199
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, et al** (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol* **13**: 614–629
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S** (2011) Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1639–1653
- Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM** (2002) The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16243–16248
- Marois E, Van den Ackerveken G, Bonas U** (2002) The Xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 637–646
- Marschner H, Marschner P** (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press
- Martin-Hernandez AM, Dufresne M, Hugouvieux V, Melton R, Osbourn A** (2000) Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1301–1311
- Massé E, Gottesman S** (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 4620–4625
- Maurer F, Müller S, Bauer P** (2011) Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiol Biochem* **49**: 530–536
- Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, Jelenska J, Joachmiak A, Missiakas DM, Schneewind O** (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**: 906–909
- McHugh JP, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC** (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* - A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 29478–29486
- Meiser J, Lingam S, Bauer P** (2011) Posttranslational Regulation of the Iron Deficiency Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor FIT Is Affected by Iron and Nitric Oxide. *Plant Physiol* **157**: 2154–2166
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980

- Meng X, Zhang S** (2013) MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 245–266
- Miethke M, Marahiel MA** (2007) Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 413–451
- Milne TJ, Abbenante G, Tyndall JDA, Halliday J, Lewis RJ** (2003) Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. *J Biol Chem* **278**: 31105–31110
- Mishina TE, Zeier J** (2007) Bacterial non-host resistance: interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiol Plant* **131**: 448–461
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 19613–19618
- Monaghan J, Zipfel C** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 349–357
- Montillet J-L, Leonhardt N, Mondy S, Tranchimand S, Rumeau D, Boudsocq M, Garcia AV, Douki T, Bigeard J, Laurière C, et al** (2013) An Absciscic Acid-Independent Oxylin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* **11**: e1001513
- Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML** (2009) The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3326–3338
- Morrissey J, Guerinot ML** (2009) Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. *Chem Rev* **109**: 4553–4567
- Moscou MJ, Bogdanove AJ** (2009) A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* **326**: 1501–1501
- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935–944
- Müller M, Schmidt W** (2004) Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**: 409–419
- Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T** (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J* **46**: 563–572
- Nachin L, Barras F** (2000) External pH: an environmental signal that helps to rationalize pel gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 882–886
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep* **32**: 959–970
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S** (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* **33**: 887–898

- Nandal A, Huggins CCO, Woodhall MR, McHugh J, Rodríguez-Quñones F, Quail MA, Guest JR, Andrews SC** (2009) Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe²⁺-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent: Fe-Fur induction of *ftnA* by H-NS antisilencing. *Mol Microbiol* **75**: 637–657
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436–439
- Nawrath C, Heck S, Parinshawong N, Metraux JP** (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**: 275–286
- Nishimura MT** (2003) Loss of a Callose Synthase Results in Salicylic Acid-Dependent Disease Resistance. *Science* **301**: 969–972
- Noma M, Noguchi M** (1976) Occurrence of nicotianamine in higher-plants. *Phytochemistry* **15**: 1701–1702
- Noma M, Noguchi M, Tamaki E** (1971) A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *Tetrahedron Lett* **12**: 2017–2020
- Nomura H, Komori T, Kobori M, Nakahira Y, Shiina T** (2008) Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure. *Plant J* **53**: 988–998
- Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2010) Phytosiderophore Efflux Transporters Are Crucial for Iron Acquisition in Graminaceous Plants. *J Biol Chem* **286**: 5446–5454
- Nurchi VM, Pivetta T, Lachowicz JI, Crisponi G** (2009) Effect of substituents on complex stability aimed at designing new iron(III) and aluminum(III) chelators. *J Inorg Biochem* **103**: 227–236
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, et al** (2008) Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem* **283**: 8885–8892
- Oide S, Moeder W, Krasnoff S, Gibson D, Haas H, Yoshioka K, Turgeon BG** (2006) NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* **18**: 2836–2853
- Park J-E, Park J-Y, Kim Y-S, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim S-Y, Kim J, Lee Y-H, Park C-M** (2007a) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 10036–10046
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007b) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113–116
- Payne SM, Wyckoff EE, Murphy ER, Oglesby AG, Boulette ML, Davies NML** (2006) Iron and Pathogenesis of *Shigella*: Iron Acquisition in the Intracellular Environment. *BioMetals* **19**: 173–180
- Pel MJC, Pieterse CMJ** (2012) Microbial recognition and evasion of host immunity. *J Exp Bot* **64**: 1237–1248

- Pelletier B, Beaudoin J, Mukai Y, Labbe S** (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **277**: 22950–22958
- Persmark M, Expert D, Neilands JB** (1989) Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J Biol Chem* **264**: 3187–3193
- Petit J, Briat J, Lobreaux S** (2001) Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem J* **359**: 575–582
- Petutschnig EK, Jones AME, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V** (2010) The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 Is a Major Chitin-binding Protein in *Arabidopsis thaliana* and Subject to Chitin-induced Phosphorylation. *J Biol Chem* **285**: 28902–28911
- Piater L** (2004) Thorsten Nürnberger Frédéric Brunner Birgit Kemmerling. *Immunol Rev* **198**: 249–266
- Pich A, Scholz G, Stephan UW** (1994) Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant Soil* **165**: 189–196
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM** (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 489–521
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H** (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 421–426
- Posey JE** (2000) Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science* **288**: 1651–1653
- Postel S, Küfner I, Beuter C, Mazzotta S, Schwedt A, Borlotti A, Halter T, Kemmerling B, Nürnberger T** (2010) The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in *Arabidopsis* development and immunity. *Eur J Cell Biol* **89**: 169–174
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ** (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**: 99–110
- Qi Z, Verma R, Gehring C, Yamaguchi Y, Zhao Y, Ryan CA, Berkowitz GA** (2010) Ca²⁺ signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21193–21198
- Qiu J-L, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, Thorgrimsen S, Palma K, Suarez-Rodriguez MC, Sandbech-Clausen S, Lichota J, et al** (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J* **27**: 2214–2221
- Quail MA, Jordan P, Grogan JM, Butt JN, Lutz M, Thomson AJ, Andrews SC, Guest JR** (1996) Spectroscopic and Voltammetric Characterisation of the Bacterioferritin-Associated Ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 635–642
- Ran LX, van Loon LC, Bakker P** (2005) No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology* **95**: 1349–1355

- Rauscher L, Expert D, Matzanke BF, Trautwein AX** (2002) Chrysobactin-dependent Iron Acquisition in *Erwinia chrysanthemi*: FUNCTIONAL STUDY OF A HOMOLOG OF THE *ESCHERICHIA COLI* FERRIC ENTEROBACTIN ESTERASE. *J Biol Chem* **277**: 2385–2395
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat J-F, Gaymard F, Cellier F** (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**: 400–412
- Raymond KN, Carrano CJ** (1979) Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc Chem Res* **12**: 183–190
- Raymond KN, Dertz EA, Kim SS** (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 3584–3588
- Rellan-Alvarez R, Giner-Martinez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodriguez-Castrillon JA, Garcia-Alonso JI, Abadia J, Alvarez-Fernandez A** (2009) Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport. *Plant Cell Physiol* **51**: 91–102
- Ren D, Liu Y, Yang K-Y, Han L, Mao G, Glazebrook J, Zhang S** (2008) A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5638–5643
- Reverchon S, Nasser W** (2013) *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme: *Dickeya dadantii* pathogenicity. *Environ Microbiol Rep* n/a–n/a
- Reverchon S, Rouanet C, Expert D, Nasser W** (2002) Characterization of indigoidine Biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J Bacteriol* **184**: 654–665
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen DA** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929–967
- Rincon-Enriquez G, Crete P, Barras F, Py B** (2008) Biogenesis of Fe/S proteins and pathogenicity: IscR plays a key role in allowing *Erwinia chrysanthemi* to adapt to hostile conditions. *Mol Microbiol* **67**: 1257–1273
- Robert-Seilanianantz A, Grant M, Jones JDG** (2011) Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *In* NK VanAlfen, G Bruening, JE Leach, eds, *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol 49. Annual Reviews, Palo Alto, pp 317–343
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694–697
- Roddick JG** (1974) The steroidal glycoalkaloid alpha -tomatine. *Phytochemistry*. doi: 10.1016/S0031-9422(00)91261-5
- Rodriguez-Celma J, Lin W-D, Fu G-M, Abadia J, Lopez-Millan A-F, Schmidt W** (2013) Mutually Exclusive Alterations in Secondary Metabolism Are Critical for the Uptake of Insoluble Iron Compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *PLANT Physiol* **162**: 1473–1485
- Roemer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T** (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* **318**: 645–648

- Rogers EE** (2002) FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* **14**: 1787–1799
- Romera FJ, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R** (2011) Latest findings about the interplay of auxin, ethylene and nitric oxide in the regulation of Fe deficiency responses by Strategy I plants. *Plant Signal Behav* **6**: 167–170
- Römheld V, Marschner H** (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol* **80**: 175–180
- Ronald P, Salmeron J, Carland F, Staskawicz B** (1992) The cloned avirulence gene *Avrpto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J Bacteriol* **174**: 1604–1611
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Toer M, de Vries S, Zipfel C** (2011) The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. *Plant Cell* **23**: 2440–2455
- Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL** (2013) Microbial siderophores: a mini review: Microbial Siderophores. *J Basic Microbiol* **53**: 303–317
- Samson R** (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1415–1427
- Santi S, Schmidt W** (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytol* **183**: 1072–1084
- Santos R** (2003) Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMx1-encoded haem oxygenase. *Microbiology* **149**: 579–588
- Santos R, Franza T, Laporte ML, Sauvage C, Touati D, Expert D** (2001) Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 758–767
- Sauvage C, Franza T, Expert D** (1996) Analysis of the *Erwinia chrysanthemi* ferrichrysobactin receptor gene: resemblance to the *Escherichia coli* *fepA-fes* bidirectional promoter region and homology with hydroxamate receptors. *J Bacteriol* **178**: 1227–1231
- Schaaf G** (2004) ZmYS1 Functions as a Proton-coupled Symporter for Phytosiderophore- and Nicotianamine-chelated Metals. *J Biol Chem* **279**: 9091–9096
- Schaaf G** (2005) A Putative Function for the Arabidopsis Fe-Phytosiderophore Transporter Homolog AtYSL2 in Fe and Zn Homeostasis. *Plant Cell Physiol* **46**: 762–774
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR** (2006) Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* **177**: 1272–1281

- Schikora A, Schmidt W** (2001) Iron stress-induced changes in root epidermal cell fate are regulated independently from physiological responses to low iron availability. *Plant Physiol* **125**: 1679–1687
- Schornack S, Moscou MJ, Ward ER, Horvath DM** (2013) Engineering Plant Disease Resistance Based on TAL Effectors. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 383–406
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, Wallner A, Arst HN, Haynes K, Haas H** (2007) Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *Plos Pathog* **3**: 1195–1207
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatos A, Halkier BA, Glawischnig E** (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**: 1248–1254
- Schuler M, Rellan-Alvarez R, Fink-Straube C, Abadia J, Bauer P** (2012) Nicotianamine Functions in the Phloem-Based Transport of Iron to Sink Organs, in Pollen Development and Pollen Tube Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 2380–2400
- Seeholzer S, Tsuchimatsu T, Jordan T, Bieri S, Pajonk S, Yang W, Jahoor A, Shimizu KK, Keller B, Schulze-Lefert P** (2010) Diversity at the Mla Powdery Mildew Resistance Locus from Cultivated Barley Reveals Sites of Positive Selection. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 497–509
- Segond D, Dellagi A, Lanquar V, Rigault M, Patrit O, Thomine S, Expert D** (2009) *NRAMP* genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J* **58**: 195–207
- Seguela M, Briat J-F, Vert G, Curie C** (2008) Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J* **55**: 289–300
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4788–4793
- Serrano M, Wang B, Aryal B, Garcion C, Abou-Mansour E, Heck S, Geisler M, Mauch F, Nawrath C, Metraux J-P** (2013) Export of Salicylic Acid from the Chloroplast Requires the Multidrug and Toxin Extrusion-Like Transporter EDS5. *Plant Physiol* **162**: 1815–1821
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J, et al** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400–U301
- Shen Q-H, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Uelker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P** (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**: 1098–1103
- Shevchik VE, Boccara M, Vedel R, Hugouvieux-Cotte-Pattat N** (1998) Processing of the pectate lyase Pell by extracellular proteases of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol* **29**: 1459–1469
- Shevchik VE, Condemine G, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N** (1999a) The exopolysaccharide lyase PelW and the oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **181**: 3912–3919

- Shevchik VE, Kester HCM, Benen JAE, Visser J, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat M** (1999b) Characterization of the exopolysaccharide lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **181**: 1652–1663
- Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, et al** (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J* **64**: 204–214
- Shouldice SR, Dougan DR, Skene RJ, Tari LW, McRee DE, Yu RH, Schryvers AB** (2003) High resolution structure of an alternate form of the ferric ion binding protein from *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem* **278**: 11513–11519
- Sia AK, Allred BE, Raymond KN** (2013) Siderocalins: Siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Curr Opin Chem Biol* **17**: 150–157
- Silipo A, Erbs G, Shinya T, Dow JM, Parrilli M, Lanzetta R, Shibuya N, Newman M-A, Molinaro A** (2009) Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* **20**: 406–419
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**: 137–147
- Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N** (2011) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* **6**:
- Sivitz A, Grinvalds C, Barberon M, Curie C, Vert G** (2011) Proteasome-mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses. *Plant J* **66**: 1044–1052
- Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SLR, Cookson BT, Aderem A** (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**: 1247–1253
- Smits THM, Rezzonico F, Kamber T, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Duffy B** (2010) Complete Genome Sequence of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and Comparison to Other *Erwinia* spp. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 384–393
- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117–2127
- Stubbe J, van der Donk WA** (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem Rev* **98**: 705–762
- Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su S-H, Jester PJ, Zhang S, Bent AF, Krysan PJ** (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **143**: 661–669
- Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Cogez V, Bonas U, Buettner D** (2010) Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* **187**: 983–1002
- Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y** (2010) The Siderophore Pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. *J Bacteriol* **192**: 117–126

- Tarantino D, Casagrande F, Soave C, Murgia I** (2010) Knocking out of the mitochondrial AtFer4 ferritin does not alter response of Arabidopsis plants to abiotic stresses. *J Plant Physiol* **167**: 453–460
- Tardy F, Nasser W, RobertBaudouy J, HugouvieuxCottePattat N** (1997) Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: Enzyme characteristics and potential inhibitors. *J Bacteriol* **179**: 2503–2511
- Teixidó L, Carrasco B, Alonso JC, Barbé J, Campoy S** (2011) Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the hliD Operator In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE* **6**: e19711
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**: 685–695
- Thomma B, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**: 163–171
- Thompson JW, Salahudeen AA, Chollangi S, Ruiz JC, Brautigam CA, Makris TM, Lipscomb JD, Tomchick DR, Bruick RK** (2012) Structural and Molecular Characterization of Iron-sensing Hemerythrin-like Domain within F-box and Leucine-rich Repeat Protein 5 (FBXL5). *J Biol Chem* **287**: 7357–7365
- Tiffin LO** (1966) Iron translocation II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physiol* **41**: 515–518
- Tomišić V, Blanc S, Elhabiri M, Expert D, Albrecht-Gary A-M** (2008) Iron(III) Uptake and Release by Chrysobactin, a Siderophore of the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Inorg Chem* **47**: 9419–9430
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci* **14**: 310–317
- Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 397–403
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) *Arabidopsis* gp91(phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 517–522
- Torres VJ, Attia AS, Mason WJ, Hood MI, Corbin BD, Beasley FC, Anderson KL, Stauff DL, McDonald WH, Zimmerman LJ, et al** (2010) *Staphylococcus aureus* Fur Regulates the Expression of Virulence Factors That Contribute to the Pathogenesis of Pneumonia. *Infect Immun* **78**: 1618–1628
- Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrer (Lahkim) L, Elphinstone JG** (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol* **60**: 385–399
- Troxell B, Hassan HM** (2013) Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. doi: 10.3389/fcimb.2013.00059

- Troxell B, Sikes ML, Fink RC, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Hassan HM** (2010) Fur Negatively Regulates hns and Is Required for the Expression of HilA and Virulence in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**: 497–505
- Tsolis RM, Baumler AJ, Heffron F, Stojiljkovic I** (1996) Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**: 4549–4556
- Turner JG, Debbage JM** (1982) Tabtoxin-induced symptoms are associated with the accumulation of ammonia formed during photorespiration. *Physiol Plant Pathol* **20**: 223–233
- Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y** (2007) Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**: 2980–2990
- Urbanowski JL** (1999) The Iron Transporter Fth1p Forms a Complex with the Fet5 Iron Oxidase and Resides on the Vacuolar Membrane. *J Biol Chem* **274**: 38061–38070
- Vansuyt G, Robin A, Briat J-F, Curie C, Lemanceau P** (2007) Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 441–447
- Verica JA, Chae L, Tong HY, Ingmire P, He ZH** (2003) Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in *arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 1732–1746
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditzjawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J** (1994) Salicylic-acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired-resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* **6**: 959–965
- Vert G** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *PLANT CELL ONLINE* **14**: 1223–1233
- Vert GA** (2003) Dual Regulation of the *Arabidopsis* High-Affinity Root Iron Uptake System by Local and Long-Distance Signals. *PLANT Physiol* **132**: 796–804
- Vigani G, Zocchi G, Bashir K, Philippar K, Briat J-F** (2013) Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends Plant Sci.*
- De Vleeschauwer D, Djavaheeri M, Bakker PAHM, Hofte M** (2008) *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against *Magnaporthe oryzae* Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. *PLANT Physiol* **148**: 1996–2012
- De Vleeschauwer D, Hofte M** (2009) Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *In* LC VanLoon, ed, *Plant Innate Immun*. Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London, pp 223–281
- Vogel J, Somerville S** (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 1897–1902
- Wagner TA, Kohorn BD** (2001) Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**: 303–318
- Wakeman CA, Skaar EP** (2012) Metalloregulation of Gram-positive pathogen physiology. *Curr Opin Microbiol* **15**: 169–174

- Walton JD** (2006) HC-toxin. *Phytochemistry* **67**: 1406–1413
- Wasternack C, Hause B** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* **111**: 1021–1058
- Waters BM, Chu H-H, DiDonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL** (2006) Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 Reveal Their Roles in Metal Ion Homeostasis and Loading of Metal Ions in Seeds. *PLANT Physiol* **141**: 1446–1458
- Wei Y, Aydin Z, Zhang Y, Liu Z, Guo M** (2012) A Turn-on Fluorescent Sensor for Imaging Labile Fe³⁺ in Live Neuronal Cells at Subcellular Resolution. *ChemBioChem* **13**: 1569–1573
- White MC, Baker FD, Chaney RL, Decker AM** (1981) Metal complexation in xylem fluid II. Theoretical equilibrium model and computational computer program. *Plant Physiol* **67**: 301–310
- White R** (1979) Acetylsalicylic-acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic-virus in tobacco. *Virology* **99**: 410–412
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 383–389
- Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Wilson MJ, Cunliffe HE, Lamont IL, Vasil ML** (2001) Characterization of an Endoprotease (PrpL) Encoded by a PvdS-Regulated Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**: 5385–5394
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–565
- Willnow T, Goldstein J, Orth K, Brown M, Herz J** (1992) Low-density-lipoprotein receptor-related protein and GP330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem* **267**: 26172–26180
- Winkelmann G** (2002) Metal Transport. *J Biol Chem* **273**: 28617–28624
- Winkelmann G** (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* **20**: 379–392
- Von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat J-F, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC** (1999) Nicotianamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* **119**: 1107–1114
- Wojnar P** (2001) Molecular Cloning of a Novel Lipocalin-1 Interacting Human Cell Membrane Receptor Using Phage Display. *J Biol Chem* **276**: 20206–20212
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Despres C** (2012) The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Rep* **1**: 639–647
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, et al** (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**: 74–80

- Yalpani N, Leon J, Lawton M, Raskin I** (1993) Pathway of salicylic-acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol* **103**: 315–321
- YAMADA A, SHIBUYA N, KODAMA O, AKATSUKA T** (1993) INDUCTION OF PHYTOALEXIN FORMATION IN SUSPENSION-CULTURED RICE CELLS BY N-ACETYL-CHITOOOLIGOSACCHARIDES. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**: 405–409
- Yamaguchi Y, Huffaker A** (2011) Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 351–357
- Yang CH, Gavilanes-Ruiz M, Okinaka Y, Vedel R, Berthuy I, Boccara M, Chen JWT, Perna NT, Keen NT** (2002) hrp genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 472–480
- Yang S, Peng Q, Francisco MS, Wang Y, Zeng Q, Yang C-H** (2008) Type III Secretion System Genes of *Dickeya dadantii* 3937 Are Induced by Plant Phenolic Acids. *Plos One* **3**: e2973
- Yap MN, Yang CH, Barak JD, Jahn CE, Charkowski AO** (2005) The *Erwinia chrysanthemi* type III secretion system is required for multicellular behavior. *J Bacteriol* **187**: 639–648
- Ye F, Albarouki E, Lingam B, Deising HB, von Wirén N** (2014) An adequate Fe nutritional status of maize suppresses infection and biotrophic growth of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol Plant* n/a–n/a
- Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N, Ma JF** (2008) OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice. *PLANT Physiol* **149**: 297–305
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JDG, Doke N** (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91(phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706–718
- You Xi Y, Zhang J, Dao Wen W, LING HQ** (2005) AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. *Cell Res* **15**: 613–621
- Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D, Ling H-Q** (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res* **18**: 385–397
- Yun C-W** (2000) The Role of the FRE Family of Plasma Membrane Reductases in the Uptake of Siderophore-Iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 10218–10223
- Zeng W, He SY** (2010) A Prominent Role of the Flagellin Receptor FLAGELLIN-SENSING2 in Mediating Stomatal Response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **153**: 1188–1198
- Zeng W, Melotto M, He SY** (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 599–603
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, et al** (2010) Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host Microbe* **7**: 290–301

- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, et al** (2007) A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* **1**: 175–185
- Zhao G** (2002) Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells. A FERRITIN-LIKE DNA-BINDING PROTEIN OF *ESCHERICHIA COLI*. *J Biol Chem* **277**: 27689–27696
- Zhou H, Lin J, Johnson A, Morgan RL, Zhong W, Ma W** (2011) *Pseudomonas syringae* Type III Effector HopZ1 Targets a Host Enzyme to Suppress Isoflavone Biosynthesis and Promote Infection in Soybean. *Cell Host Microbe* **9**: 177–186
- Zhou N, Tootle TL, Tsui F, Klessig DF, Glazebrook J** (1998) PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1021–1030

Etude du rôle des sidérophores microbiens dans la modulation des défenses de la plante *Arabidopsis thaliana*

Le fer est un élément essentiel pour presque tous les êtres vivants cependant, il est peu biodisponible et est toxique dans sa forme libre car il engendre des formes réactives de l'oxygène *via* la réaction de Fenton. Pour se procurer le fer, les microorganismes sécrètent de petites molécules nommées sidérophores ayant une très forte affinité pour Fe^{3+} . Les sidérophores sont requis pour la pathogénie de plusieurs agents pathogènes sur hôtes animaux ou végétaux, mais ce sont également des éliciteurs de défense. Des travaux antérieurs ont montré que les sidérophores activent les défenses et les gènes de réponse à la carence en fer chez *Arabidopsis thaliana*. L'activation de réponses de défense par le sidérophore requiert un niveau physiologique de fer dans la plante indiquant que le fer participe à la mise en place de ce processus. Au cours de ma thèse, les réponses globales de la plante *A. thaliana* au sidérophore deferrioxamine (DFO) ont été étudiées par une approche transcriptome. Les résultats obtenus montrent que le principal processus activé est l'immunité. En utilisant des chélateurs de fer différents, j'ai montré que l'effet chélation du fer est responsable de l'activation de l'immunité. Le traitement sidérophore provoque également une perturbation de l'homéostasie du fer et d'autres métaux dans la plante. Dans un mutant *irt1* affecté dans le transport de plusieurs métaux lourds dont le fer, l'activation des défenses par la DFO est compromise. Par ailleurs, j'ai étudié l'effet du statut en fer de la plante sur sa sensibilité à la bactérie pathogène *Dickeya dadantii* et sur l'expression des défenses. Il apparaît que le fer est requis pour la mise en place de plusieurs processus de défense en réponse à *D. dadantii*. Les plantes carencées en fer sont plus résistantes à l'infection. Une quantité de fer physiologique dans la plante est requise pour la multiplication bactérienne et pour l'expression des facteurs de pathogénie, les pectate lyases. Le marquage du fer par la méthode Perls'-DAB- H_2O_2 montre que celui-ci est très peu abondant dans les tissus végétaux contenant les bactéries qui, elles, sont chargées de fer. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que le fer est requis dans l'arsenal défensif de la plante mais qu'il est également un facteur limitant pour le cycle infectieux de *D. dadantii*.

Mots-clés: sidérophore, *Arabidopsis thaliana*, défense des plantes, fer, éliciteur, *Dickeya dadantii*.

Study of the role of microbial siderophores in modulating immunity from the plant *Arabidopsis thaliana*.

Iron is an essential element for almost all living organisms, however, it is not bioavailable and is toxic in its free form as it generates reactive oxygen species via the Fenton reaction. To obtain iron, microorganisms secrete small molecules named siderophores with very high affinity for Fe^{3+} . Siderophores are required for the pathogenesis of several pathogens on animals or plants, but they also are elicitors of defenses. Previous work has shown that siderophores activate defenses and iron deficiency response genes in *Arabidopsis thaliana*. The activation of defense responses by the siderophore requires a physiological level of iron in the plant indicating that iron is involved in the activation of this process. In my thesis, the global response of the plant *A. thaliana* to the siderophore deferrioxamine (DFO) has been studied by a transcriptomic approach. The results obtained show that the main process being activated is immunity. By using different iron chelating agents, I have shown that the iron chelation effect is responsible for the activation of immunity. The siderophore treatment also causes disturbance in the homeostasis of iron and other metals in the plant. In an *irt1* mutant affected in the transport of heavy metals including iron, activation of defenses by the DFO is compromised. In addition, I studied the effect of iron status of the plant on its susceptibility to the pathogenic bacteria *Dickeya dadantii* and on the expression of defenses. It appears that iron is required for the establishment of several defense processes in response to *D. dadantii*. The iron deficient plants are more resistant to infection. A physiological amount of iron in the plant is required for bacterial growth and for expression of the virulence factors, pectate lyases. Iron staining by the Perls' -DAB - H_2O_2 method shows that low abundance of this metal in plant tissue coincides with the presence of bacteria, which contain high amounts of iron. Overall, our results show that iron is required in the defense arsenal of the plant but it is also a limiting factor for the infectious cycle of *D. dadantii*.

Keywords: siderophore, *Arabidopsis thaliana*, plant defense, iron, elicitor, *Dickeya dadantii*.